



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift

⑩ DE 196 54 610 A 1

⑮ Int. Cl. 6:

C 07 K 14/715

A 61 K 38/17

C 12 N 15/11

C 12 N 15/12

C 12 N 15/85

C 12 N 15/70

C 12 N 5/10

C 12 N 1/00

C 12 N 1/21

A 01 K 67/027

C 07 K 16/28

G 01 N 33/53

// (C12N 1/21, C12R 1:19)

⑳ Unionspriorität: ㉑ ㉒ ㉓ ㉔
22.12.95 US 577788 03.09.96 US 706945

㉕ Anmelder:
Amgen Inc., Thousand Oaks, Calif., US

㉖ Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

㉗ Erfinder:
Boyle, William J., Moorpark, Calif., US; Lacey, David L., Thousand Oaks, Calif., US; Calzone, Frank J., Westlake Village, Calif., US; Chang, Ming-Shi, Newbury Park, Calif., US

㉘ Osteoprotegerin

㉙ Die vorliegende Erfindung offenbart ein neues sezerniertes Polypeptid mit der Bezeichnung Osteoprotegerin, welches ein Vertreter der Superfamilie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren ist und bei der Regulation des Knochenstoffwechsels beteiligt ist. Gleichermassen offenbart werden Nukleinsäuren, die für Osteoprotegerin kodieren, Polypeptide, rekombinante Vektoren und Wirtszellen für die Expression, Antikörper, die OPG binden, sowie pharmazeutische Zusammensetzungen. Die Polypeptide werden zur Behandlung von Knochenstörungen verwendet, die durch erhöhte Resorption gekennzeichnet sind, wie Osteoporose.

DE 196 54 610 A1

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft im allgemeinen Polypeptide, die an der Steuerung des Knochenstoffwechsels beteiligt sind. Insbesondere betrifft die Erfindung ein neues Polypeptid mit der Bezeichnung Osteoprotegerin, welches ein Vertreter der Superfamilie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren ist. Das Polypeptid wird zur Behandlung von Knochenerkrankungen wie Osteoporose verwendet, die durch erhöhten Knochenschwund gekennzeichnet sind.
10

Hintergrund der Erfindung

15 Wachstumsfaktoren und Zytokine in Form von Polypeptiden sind sezernierte Faktoren, die vielfältige Veränderungen im Zusammenhang mit dem Zellwachstum, der Differenzierung und dem Stoffwechsel signalisieren, indem sie in spezifischer Weise an diskrete, oberflächengebundene Rezeptoren binden. Als eine Klasse von Proteinen variieren die Rezeptoren in ihrer Struktur sowie in der Art und Weise der Signalübertragung. Sie sind gekennzeichnet durch eine extrazelluläre Domäne, die an der Ligandenbindung beteiligt ist, und eine zytoplasmatische Domäne, die ein geeignetes intrazelluläres Signal überträgt. Die Rezeptor-Expressionsmuster legen 20 ultimativ fest, welche Zellen auf einen gegebenen Liganden ansprechen werden, während die Struktur eines gegebenen Rezeptors die durch die Ligandenbindung induzierte zelluläre Antwort festlegt. Es ist gezeigt worden, daß Rezeptoren intrazelluläre Signale über ihre zytoplasmatischen Domänen übertragen durch Aktivierung der Phosphorylierung der Proteinkomponenten Tyrosin oder Serin/Threonin (z. B. platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) oder transforming growth factor- β receptor-I (TGF β R-I), durch Stimulierung der G-Protein-Aktivierung (z. B. β -Adrenozeptor), und durch modulierende Assoziationen mit zytoplasmatischen, signalübertragenden Proteinen (z. B. TNFR-1 und Fas/APO) (Heldin, Cell 80, 213–223 (1995)).
25

Die Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie ist eine Gruppe von Typ I-Transmembranproteinen, die gemeinsam über ein konserviertes, Cystein-reiches Motiv verfügen, welches in der extrazellulären Domäne 3 bis 6 mal wiederholt wird (Smith et al., Cell 76, 953–962 (1994)). Zusammen bilden diese Wiederholungseinheiten die Ligandenbindungsdomänen dieser Rezeptoren (Chen et al., Chemistry 270, 2874–2878 (1995)). Die Liganden für diese Rezeptoren gehören zu einer strukturell verwandten Gruppe von Proteinen, die Homologie zu TNF α aufweisen (Goeddel et al., Cold Spring Harbor Symp. Quart. Biol. 51, 597–609 (1986); Nagata et al., Science 267, 1449–1456 (1995)). TNF α bindet an die verschiedenen, aber nahe verwandten Rezeptoren TNFR-1 und TNFR-2. TNF α löst in Rezeptor tragenden Zellen eine Vielzahl von biologischen 35 Antworten aus, einschließlich Proliferation, Differenzierung sowie Zytotoxizität und Apoptose (Beutler et al., Ann. Rev. Biochem. 57, 505–518 (1988)).

Es wird davon ausgegangen, daß TNF α akute und chronische entzündliche Reaktionen vermittelt (Beutler et al., Ann. Rev. Biochem. 57, 505–508 (1988)). Ein systemischer Ausstoß von TNF α induziert einen toxischen Schock und eine ausgedehnte Gewebekreose. Aus diesem Grund kann TNF α für die schwere Morbidität und Mortalität verantwortlich sein, die mit einer Vielzahl von infektiösen Erkrankungen einschließlich Sepsis assoziiert sind. Mutationen in FasL, dem Liganden für den TNFR-verwandten Rezeptor Fas/APO (Suda et al., Cell 75, 1169–1178 (1993)), ist mit der Autoimmunität assoziiert (Fisher et al., Cell 81, 935–946 (1995)), während eine Überproduktion von FasL an der durch Drogen induzierten Hepatitis beteiligt sein kann. Demgemäß werden die schwerwiegenden Effekte vieler Erkrankungszustände häufig durch Liganden für die vielfältigen TNFR-verwandten Proteine vermittelt, wodurch nahegelegt wird, daß Mittel, welche die Aktivität dieser Liganden neutralisieren, eine therapeutische Bedeutung aufweisen würden. Lösliche TNFR-1-Rezeptoren sowie Antikörper, die TNF α binden, sind auf ihre Fähigkeit zur Neutralisierung von systemischem TNF α untersucht worden (Loetscher et al., Cancer Cells 3 (6), 21–226 (1991)). Eine natürlich auftretende Form einer mRNA für den sezernierten TNFR-1 wurde kürzlich kloniert, und ihr Produkt wurde auf seine Fähigkeit zur Neutralisierung der TNF α -Aktivität in vitro und in vivo untersucht (Kohno et al., PNAS USA 87, 8331–8335 (1990)). Die Fähigkeit dieses Proteins zur Neutralisierung von TNF α weist darauf hin, daß lösliche TNF-Rezeptoren die Bindung und Clearance von TNF bewirken, wodurch die zytotoxischen Effekte auf TNFR aufweisende Zellen blockiert werden.

Ein Ziel der Erfindung liegt in der Identifizierung neuer Vertreter der TNFR-Superfamilie. Es wird davon ausgegangen, daß neue Familienmitglieder Transmembranproteine oder lösliche Formen derselben sein können, die extrazelluläre Domänen umfassen, denen jedoch zytoplasmatische und Transmembrandomänen fehlen. Wir haben einen neuen Vertreter der TNFR-Superfamilie identifiziert, welcher für ein sezerniertes Protein kodiert, das dem TNFR-2 nahe verwandt ist. In Analogie zum löslichen TNFR-1 kann das mit TNFR-2 verwandte Protein die Aktivität seines Liganden in negativer Weise regulieren und demgemäß bei der Behandlung von bestimmten menschlichen Erkrankungen nützlich sein.

Zusammenfassung der Erfindung

Ein neuer Vertreter der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie ist unter Verwendung einer intestinalen cDNA-Bibliothek einer fetalen Ratte identifiziert worden. Es wurde in cDNA-Klon vollständiger Länge erhalten und sequenziert. Die Expression der Ratten-cDNA in einer transgenen Maus führte zu einem deutlichen Anstieg der Knochendichte, insbesondere in Röhrenknochen, Beckenknochen und Wirbeln. Das in der cDNA kodiert Polypeptid wird mit Osteoprotegerin (OPG) bezeichnet und spielt eine Rolle bei der

Förderung der Knochenakkumulation.

Durch die vorliegende Erfindung werden Nukleinsäuren bereitgestellt, die für ein Polypeptid kodieren, welches mindestens eine der biologischen Aktivitäten von OPG aufweist. Ferner werden Nukleinsäuren bereitgestellt, die mit Nukleinsäuren hybridisieren, welche für das OPG der Maus, der Ratte oder des Menschen gemäß Darstellung in den Fig. 2B–2C (SEQ ID NO: 120), 9A–9B (SEQ ID NO: 122) und 9C–9D (SEQ ID NO: 124) kodieren. Vorzugsweise ist das OPG Säuger-OPG und am meisten bevorzugt humanes OPG. Ferner werden rekombinante Vektoren und Wirtszellen, die OPG exprimieren, wie auch Verfahren zur Herstellung von rekombinantem OPG umfaßt. Gleichermaßen werden Antikörper oder Fragmente derselben offenbart, die in spezifischer Weise an das Polypeptid binden.

Durch die Erfindung werden auch Verfahren zur Behandlung von Knochenerkrankungen bereitgestellt. Die Polypeptide sind geeignet zur Prävention einer Knochenresorption und können zur Behandlung irgendeines Zustandes eingesetzt werden, der zum Knochenschwund führt, wie Osteoporose, Hyperkalzämie, Paget-Krankheit, und Knochenschwund aufgrund einer rheumatoiden Arthritis oder Osteomyelitis, und dergleichen. Knochenerkrankungen können unter Verwendung der erfundungsgemäßen Nukleinsäuren auch mittels Antisense- oder Gentherapie behandelt werden. Schließlich werden auch pharmazeutische Zusammensetzungen bereitgestellt, die OPG-Nukleinsäuren und -Polypeptide umfassen.

Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 A. FASTA-Analyse des neuen EST LORF. Gezeigt ist das Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenz von FRI-1 gegenüber der humanen Sequenz von TNFR-2. B. Profilanalyse des neuen EST LORF. Gezeigt ist das Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenz von FRI-1 gegenüber dem TNFR-Profil. C. Struktursicht der TNFR-Superfamilie, in der die Region mit Homologie zum neuen FR-1 angegeben ist.

Fig. 2 Struktur und Sequenz vollständiger Länge des OPG-Gens der Ratte, einem neuen Vertreter der TNFR-Superfamilie. A. Karte des pMOB-B1.1-Inserts. Der Kasten zeigt die Position des LORF innerhalb der cDNA-Sequenz (fette Linie). Das schwarze Kästchen zeigt das Signalpeptid, und graue Ellipsen geben die Position Cystein-reicher Wiederholungssequenzen an. B, C. Nukleinsäure- und Proteinsequenz der OPG-cDNA der Ratte. Das vorhergesagte Signalpeptid ist unterstrichen, und potentielle Stellen einer N-verknüpften Glykosylierung sind durch fette, unterstrichene Buchstaben gekennzeichnet. D, E. Verdichteter Sequenzvergleich (Wisconsin GCG Package, Version 8.1) von OPG mit anderen Vertretern der TNFR-Superfamilie, fas (SEQ ID NO 128); tnfr1 (SEQ ID NO: 129); sfu-t2 (SEQ ID NO: 130); tnfr2 (SEQ ID NO: 131); cd40 (SEQ ID NO: 132); osteo (SEQ ID NO: 133); ngfr (SEQ ID NO: 134); ox40 (SEQ ID NO: 135); 41bb (SEQ ID NO: 136).

Fig. 3 PepPlot-Analyse (Wiscons in GCG Package, Version 8.1) der vorhergesagten OPG-Proteinsequenz der Ratte. A. Schematische Darstellung von Ratten-OPG, in der hydrophobe (oben) und hydrophile (unten) Aminosäuren angegeben sind. Ebenfalls gezeigt sind basische (oben) und saure (unten) Aminosäuren. B. Darstellung von Aminosäureresten, die gemäß Definition von Chou und Fasman (Adv. Enz. 47, 45–147 (1948)) β -Faltblattbildend (oben) und β -Faltblatt-brechend (unten) sind. C. Darstellung der Ausmaße der Neigung zur Ausbildung einer α -Helix- und β -Faltblatt-Struktur (Chou und Fasman, ibid.). Die Kurven über 1.00 zeigen die Neigung zur Ausbildung einer α -Helix- oder β -Faltblatt-Struktur. Die Struktur kann in Regionen des Proteins terminieren, in denen die Kurve unterhalb von 1.00 abfällt. D. Darstellung von Resten, die α -bildend (oben) oder α -brechend (unten) sind. E. Darstellung von Bereichen der Proteinsequenz, die Sequenzen ähneln, welche typischerweise am Aminoende von α - und β -Strukturen gefunden werden (Chou und Fasman, ibid.). F. Darstellung von Bereichen der Proteinsequenz, die Sequenzen ähneln, welche typischerweise am Carboxyende von α - und β -Strukturen gefunden werden (Chou und Fasman, ibid.). G. Darstellung von Bereichen der Proteinsequenz, die typischerweise in Windungen gefunden werden (Chou und Fasman, ibid.). H. Darstellung des helikalen hydrophoben Moments (Eisenberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 140–144 (1984)) an jeder Position in der Sequenz. I. Darstellung der mittleren Hydropathie nach Kyte und Doolittle (J. Mol. Biol. 157, 105–132 (1982)) und Goldman et al. (Überblick in Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 15, 321–353 (1986)).

Fig. 4 mRNA-Expressionsmuster für die OPG-cDNA in humanen Geweben. Northern Blots wurden mit einem mit 32 P markierten Insert der Ratten-cDNA (A, beide Abbildungen links) oder mit dem Insert aus humander cDNA (B, rechte Abbildung) sondiert.

Fig. 5 Schaffung von transgenen Mäusen, die die OPG-cDNA in Hepatozyten exprimieren. Northern Blot-Expression des HE-OPG-Transgens in Mäuseleber.

Fig. 6 Erhöhung der Knochendichte in OPG-transgenen Mäusen. Abbildungen A-F. Kontrollmäuse. G-J. OPG exprimierende Mäuse. Bei der Nekropsie wurden von sämtlichen Tieren Röntgenaufnahmen und Photographien hergestellt. In A-F sind die Röntgenaufnahmen der Kontrolltiere und des einen transgenen Nicht-Expressors (#28) dargestellt. Beachte, daß die Knochen einen klar definierten Kortex und eine aufgehellt, zentrale Knochenmarkhöhle aufweisen. Im Gegensatz dazu weisen die OPG (G-J)-Tiere einen schwach definierten Kortex und eine erhöhte Dichte in der Markzone auf.

Fig. 7 Zunahme der Substantia spongiosa bei OPG-transgenen Mäusen. A-D. Repräsentative Mikrophotographien von Knochen der Kontrolltiere. In A und B sind schwach ($4\times$, $10\times$) vergrößerte Abbildungen der Oberschenkel dargestellt (Masson Trichrome-Färbemittel). Die Färbungen für Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) zeigen Osteoklasten (siehe Pfeile), die sowohl Knorpel (C) als auch Substantia spongiosa (D) resorbieren. Beachte das abgeflachte Erscheinungsbild der Osteoklasten auf der Substantia spongiosa. E-H. Repräsentative Mikrophotographien von Knochen der OPG exprimierenden Tiere. In E und F sind schwach ($4\times$, $10\times$) vergrößerte Abbildungen der Oberschenkel dargestellt (Masson Trichrome-Färbungsmittel). Die klare Region ist die Knorpelwachstumszone, der blau gefärbte Bereich ist Knochen, und der rote Bereich ist Knochenmark. Beachte, daß die Substantia spongiosa im Gegensatz zu den Kontrollen nicht resorbiert worden

ist, was dazu führt, daß die gewöhnliche Markhöhle fehlt. Ferner weisen die resultierenden Trabekel ein geschecktes Erscheinungsbild mit blauen und klaren Bereichen auf. Die klaren Bereiche sind Überreste der Knorpelwachstumszone, die niemals umgeformt worden sind. Anhand von TRAP-Färbungen zeigen diese Tiere Osteoklasten (siehe Pfeile) an der Wachstumszone (G), die in ihrer Anzahl reduziert sein können. Die von der Wachstumszone abgewandten Oberflächen der Trabekel sind jedoch praktisch frei von Osteoklasten (H); dies ist ein Befund, der zu den Kontrolltieren in direktem Widerspruch steht (siehe D).

Fig. 8 HE-OPG-Expressoren weisen keinen Defekt in der Monozyten-Makrophagen-Entwicklung auf. Eine Ursache für die Osteopetrosie bei Mäusen ist die aufgrund einer Punktmutation in dem Gen M-CSF defekte Produktion von M-CSF. Dies führt zu einem deutlichen Mangel an zirkulierenden und gewebetypischen Makrophagen. Das periphere Blut von OPG-Expressoren enthielt Monozyten, wie durch H1E-Analyse ermittelt wurde. Um das Vorhandensein von gewebetypischen Makrophagen zu bestätigen, erfolgte eine Immunhistochemie unter Verwendung von F480-Antikörpern, die ein Zelloberflächenantigen auf murinen Makrophagen erkennen. A und C zeigen schwach (4 ×) vergrößerte Mikrophotographien der Milzorgane von normalen und CR1-Überexpressoren. Beachte, daß beide Tiere zahlreiche F480-positive Zellen aufweisen. Die Monozyten-Makrophagen waren im Knochenmark von normalen (B) und HE-OPG-Überexpressoren (D) ebenfalls vorhanden (40 ×).

Fig. 9 Struktur und Sequenz von murinen und humanen OPG-cDNA-Klonen. A, B, cDNA- und Proteinsequenz der Maus. C, D, cDNA- und Proteinsequenz des Menschen. Die vorhergesagten Signalpeptide sind unterstrichen, und potentielle Stellen einer N-verknüpften Glykosylierung sind fett gekennzeichnet. E, F, Sequenz-Alignment und Vergleich der OPG-Aminosäuresequenzen von Ratte, Maus und Mensch.

Fig. 10 Vergleich der konservierten Sequenzen in der extrazellulären Domäne von TNFR-1 und humanem OPG. PrettyPlot (Wisconsin GCG Package, Version 8.1)-Analyse des in Beispiel 6 beschriebenen TNFR1- und OPG-Alignments. In der oberen Zeile sind die für die Domänen 1–4 kodierenden humanen TNFR1-Sequenzen angegeben. In der unteren Zeile sind die für die Domänen 1–4 kodierenden humanen OPG-Sequenzen angegeben. Die konservierten Reste sind durch Kästchen hervorgehoben.

Fig. 11 Dreidimensionale Darstellung von humanem OPG. Seitenansicht der Molescript-Darstellung der vorhergesagten dreidimensionalen Struktur der humanen OPG-Reste 25 bis 163 (breite Linie), kokristallisiert mit humanem TNF β (dünne Linie). Als Bezugspunkt für die Orientierung weisen die fett gedruckten Pfeile entlang des OPG-Polypeptidrückgrats von der N-terminalen zur C-terminalen Richtung. Die Position individueller Cystein-Seitenketten sind entlang des Polypeptidrückgrats insertiert, um das Aufzeigen der getrennten Cystein-reichen Domänen zu unterstützen. Das TNF β -Molekül ist ausgerichtet wie beschrieben von Banner et al. (1993).

Fig. 12 Struktur der Cystein-reichen OPG-Domänen. Alignment der humanen (obere Zeile, SEQ ID NO: 136) und murinen (untere Zeile) OPG-Aminosäuresequenzen, wodurch die vorhergesagte Domänenstruktur von OPG hervorgehoben wird. Das Polypeptid ist in zwei Hälften unterteilt, den N-Terminus (A) und den C-Terminus (B). Die N-terminale Hälfte enthält nach Vorhersage vier Cystein-reiche Domänen (bezeichnet mit 1–4). Die vorhergesagten, innerhalb der Ketten befindlichen Disulfidbindungen sind mittels fett gedruckter Linien angegeben und mit "SS1", "SS2" oder "SS3" bezeichnet. Vorhersagegemäß bilden das Tyrosin 28 und das Histidin 75 (unterstrichen) eine ionische Wechselwirkung aus. Diejenigen Aminosäuren, von denen vorhergesagt wird, daß sie mit einem OPG-Liganden interagieren, sind durch fett gedruckte Punkte oberhalb des betreffenden Rests gekennzeichnet. Die in der C-terminalen Hälfte von OPG lokalisierten Cysteinreste sind durch Kästchen gekennzeichnet.

Fig. 13 Expression und Sekretion von Maus-OPG-Fc-Fusionsproteinen in vollständiger Länge und in verkürzter Form. A. Karte, in der die Punkte der Fusion mit der humanen IgG1 Fc-Domäne durch Pfeilköpfe angegeben sind. B. Silberfärbung eines SDS-Polyacrylamidgels von konditioniertem Medium, erhalten von F1Fc (OPG vollständiger Länge, fusioniert mit Fc am Leucin 401) und CT.Fc (carboxyterminal verkürztes OPG, fusioniert mit Fc am Threonin 180)-Fusionsprotein-Expressionsvektoren. Spur 1, Mutter-Expressionsvektor-Zelllinie pCEP4; Spur 2, F1Fc-Vektor-Zelllinie; Spur 3, CT.Fc-Vektor-Zelllinie. C. Western Blot von konditioniertem Medium, erhalten von F1.Fc- und CT.Fc-Fusionsprotein-Expressionsvektoren, sondiert mit Antikörpern gegen die humane IgG1 Fc-Domäne (Pierce). Spur 1, Mutter-Expressionsvektor-Zelllinie pCEP4; Spur 2, F1.Fc-Vektor-Zelllinie; Spur 3, CT.Fc-Vektor-Zelllinie.

Fig. 14 Expression von humanem OPG in E. coli. A. Herstellung eines bakteriellen Expressionsvektors. Der LORF des humanen OPG-Gens wurde mittels PCR amplifiziert und anschließend mit einem Oligonukleotid-Linkerfragment verknüpft (oberer Strang ist SEQ ID NO: 137; unterer Strang ist SEQ ID NO: 127) und mit der DNA des Vektors pAMG21 ligiert. Der resultierende Vektor ist in der Lage zur Expression der OPG-Reste 32–401, verknüpft mit einem N-terminalen Methioninrest. B. SDS-PAGE-Analyse von nicht-induzierten und induzierten Bakterien, die das Plasmid pAMG21-human OPG-32-401 enthalten. Spur 1, MW-Standards; Spur 2, nicht-induzierte Bakterien; Spur 3, Inkubation bei 30°C; Spur 4, Inkubation bei 37°C; Spur 5, Lysat vollständiger Zellen aus der Induktion bei 37°C; Spur 6, lösliche Fraktion des Gesamt-Zellysats; Spur 7, unlösliche Fraktion des Gesamt-Zellysats; Spur 8, gereinigte Einschlüsse, erhalten aus dem Gesamt-Zellysat.

Fig. 15 Analyse von in CHO-Zellen produziertem rekombinantern murinen OPG mittels SDS-PAGE und Western Blotting. Eine gleiche Menge von CHO-konditioniertem Medium wurde auf jede dargestellt Spur aufgetragen und durch Behandlung mit reduzierendem Probenpuffer (linke Spur) oder nicht-reduzierendem Probenpuffer (rechte Spur) präpariert. Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nylonmembran überführt und anschließend mit Anti-OPG-Antikörpern sondiert. Die relativen Positionen der monomeren, 55 kD großen sowie der dimeren, 100 kD großen Formen von OPG sind durch Pfeilköpfe gekennzeichnet.

Fig. 16 Analyse von in CHO-Zellen produziertem, rekombinantern murinen OPG durch Pulsmarkierung. Die CHO-Zellen wurden mit 35 S-Methionin/Cystein pulsmarkiert und anschließend für die angegebene Zeitdauer

DE 196 54 610 A1

einem Chase unterzogen. Metabolisch markierte Kulturen wurden in konditioniertes Medium und Zellen getrennt, und aus beiden Fraktionen wurden Detergensextrakte hergestellt, geklärt und anschließend mit Anti-OPG-Antikörpern immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, bevor ein Film aufgelegt wurde. Obere linke und rechte Abbildung; Proben, die unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert wurden. Untere linke und rechte Abbildung; Proben, die unter reduzierenden Bedingungen analysiert wurden. Obere und untere linke Abbildung; Zellextrakte. Obere und untere rechte Abbildung; Extrakte konditionierter Medien. Die relative Mobilität der 55 kD großen monomeren und der 100 kD großen dimeren Formen von OPG sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet.

Fig. 17 Expression von OPG in der Zelllinie CTLL-2. Serumfreies, konditioniertes Medium von CTLL-2-Zellen und mit muOPG [1-401] transfizierten CHO-Zellen wurde hergestellt, konzentriert und anschließend durch eine nicht-reduzierende SDS-PAGE und Western Blotting analysiert. Linke Spur; konditioniertes Medium von CTLL-2. Rechte Spur; konditioniertes Medium von CHO-muOPG. Die relative Mobilität der 55 kD großen monomeren und der 100 kD großen dimeren Formen von OPG sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet.

Fig. 18 Nachweis der OPG-Expression in Serumproben und Leberextrakten, die von Kontroll- und OPG-transgenen Mäusen erhalten wurden. Die transgenen Mäuse wurden wie in Beispiel 4 beschrieben geschaffen. Die OPG-Expression wurde nach SDS-PAGE und anschließendem Western Blotting unter Verwendung von Anti-OPG-Antikörpern sichtbar gemacht.

Fig. 19 Effekte des huOPG [22-401]-Fc-Fusionsproteins auf die Osteoklastenbildung in vitro. Der Assay über die Osteoklastenbildung wurde gemäß Darlegung in Beispiel 11A in Abwesenheit (Kontrolle) oder Anwesenheit der angegebenen Mengen des huOPG [22-401]-Fc-Fusionsproteins durchgeführt. Die Osteoklastenbildung wurde durch histochemische Färbung für Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) sichtbar gemacht. A. Endkonzentration an zugegebenem OPG 100 ng/ml. D. Endkonzentration an zugegebenem OPG 0,1 ng/ml. E. Endkonzentration an zugegebenem OPG 0,01 ng/ml. F. Endkonzentration an zugegebenem OPG 0,001 ng/ml. G. Kontrolle. Kein OPG zugegeben.

Fig. 20 Absenkung der Osteoklastenkultur-TRAP-Aktivität durch 10 steigende Mengen an OPG. Angegebene Konzentrationen des huOPG [22-401]-Fc-Fusionsproteins wurden dem Assay über die Osteoklastenbildung zugegeben, und die TRAP-Aktivität wurde wie in Beispiel 11A beschrieben quantifiziert.

Fig. 21 Effekt von OPG auf eine terminale Phase der Osteoklastendifferenzierung. Die huOPG [22-401]-Fc-Fusion wurde dem Assay über die Osteoklastenbildung während der intermediären Phase der Osteoklastenreifung (Tage 5–6; OPG-CTL) oder während der terminalen Phase der Osteoklastenreifung (Tage 7–15; CTL-OPG) zugegeben. Die TRAP-Aktivität wurde quantifiziert und mit den bei Abwesenheit von OPG (CTL-CTL) und bei voller Anwesenheit von OPG (OPG-OPG) beobachteten Aktivitäten verglichen.

Fig. 22 Effekte von IL-1 β , IL-1 α und OPG auf die Blutwerte an ionisiertem Calcium in Mäusen. Die Blutwerte für ionisiertes Calcium wurden aufgezeichnet nach Injektion von IL-1 β allein, IL-1 α allein, IL-1 β plus muOPG [22-401]-Fc, IL-1 α plus muOPG [22-401]-Fc, und muOPG [22-401]-Fc allein. Kontrollmäuse erhielten lediglich Injektionen von phosphatgepufferter Saline (PBS). Das Experiment bezüglich IL-1 β ist in A dargestellt; das Experiment zu IL-1 α ist in B dargestellt.

Fig. 23 Effekte von OPG auf Calvaria-Osteoklasten in Kontroll- und mit IL-1 behandelten Mäusen. Die histologischen Verfahren zur Analyse von Calvaria-Knochenproben von Mäusen sind im Beispiel 11B beschrieben. Die Pfeile weisen auf Osteoklasten hin, die in am 2. Tag behandelten Mäusen vorhanden waren. Calvaria-Proben von Mäusen, die vier PBS-Injektionen täglich (A), eine Injektion von IL-1 und 3 Injektionen von PBS täglich (B), eine Injektion von PBS und 3 Injektionen von OPG täglich (C), eine Injektion von IL-1 und 3 Injektionen von OPG täglich erhielten.

Fig. 24 Röntgenanalyse der Knochenakkumulation in der Markhöhle von normalen Mäusen. Die Mäuse erhielten subkutane Injektionen mit Saline (A) oder muOPG [22-401]-Fc-Fusionsprotein (5 mg/kg/Tg.) für 14 Tage (B), und die Knochendichte wurde wie in Beispiel 11C beschrieben ermittelt.

Fig. 25 Histomorphometrische Analyse der Knochenakkumulation in der Markhöhle von normalen Mäusen. Die Injektionen sowie die Knochenhistologie erfolgten gemäß Darlegung in Beispiel 11C.

Fig. 26 Histologische Analyse der Knochenakkumulation in der Markhöhle von normalen Mäusen. Die Injektionen und die Knochenhistologie erfolgten gemäß Darlegung in Beispiel 11C. A. Injektion von Saline. B. Injektion des muOPG [22-401]-Fc-Fusionsproteins.

Fig. 27 Aktivität von OPG, das an Ovarektomie-Ratten verabreicht wurde. In diesem 2-wöchigen Experiment wird der Trend zur verminderten Knochendichte offenbar durch OPG oder andere anti-resorpitive Therapien blockiert. DEXA-Messungen erfolgten zum Zeitpunkt der Ovarektomie und in den Wochen 1 und 2 der Behandlung. Die Ergebnisse sind ausgedrückt als prozentuale Veränderung der ursprünglichen Knochendichte (Mittelwert \pm SA).

Fig. 28 Die durch Anwendung histomorphometrischer Verfahren gemessene Knochendichte in der femoralen Metaphyse ist in Ovarektomie-Ratten (OVX) 17 Tage nach Ovarektomie geringer als in scheinoperierten Tieren (SHAM). Dieser Effekt wurde durch OPG-Fc blockiert, wobei mit OPG-Fc behandelte Ovarektomie-Ratten (OVX + OPG) eine signifikant höhere Knochendichte aufwiesen als mit Trägerstoff behandelte Ovarektomie-Ratten (OVX). (Mittelwert \pm SA).

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Ein neuer Vertreter der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie wurde identifiziert als ein aus einer intestinalen cDNA-Bibliothek einer fetalen Ratte isolierter exprimierter Sequenz-Tag (expressed sequence tag) (EST). Die Strukturen der cDNA-Klonen der Ratte in vollständiger Länge und der korrespondierenden murinen und humanen cDNA-Klonen wurden gemäß Darlegung in den Beispielen 1 und 6 bestimmt. Die Gene

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

DE 196 54 610 A1

der Ratte, der Maus und des Menschen sind in den Fig. 2B—2C (SEQ ID NO: 120), 9A—9B (SEQ ID NO: 122) bzw. 9C—9D (SEQ ID NO: 124) dargestellt. Sämtliche drei Sequenzen zeigen eine große Ähnlichkeit mit den extrazellulären Domänen von Mitgliedern der TNFR-Familie. Keiner der isolierten cDNA-Klone vollständiger Länge kodierte für zytoplasmatische und Transmembrandomänen, die man bei membrangebundenen Rezeptoren erwarten würde, was darauf hinweist, daß diese cDNAs eher für lösliche, sezernierte Proteine als für Zelloberflächenrezeptoren kodieren. Ein in Fig. 9D dargestellter, die Nukleotide 1200—1353 abdeckender Bereich des humanen Gens wurde am 22. November 1995 unter der Zugriffsnummer 17188769 bei der Genebank database hinterlegt.

Die Gewebeverteilung der mRNA der Ratte und des Menschen wurde gemäß Darlegung in Beispiel 2 ermittelt. Bei der Ratte wurde die Expression von mRNA in der Niere, der Leber, der Plazenta und im Herzen nachgewiesen, wobei die höchste Expression in der Niere vorlag. Die Expression im Skelettmuskel und in der Bauchspeicheldrüse wurde ebenfalls nachgewiesen. Bei Menschen wurde die Expression in den selben Geweben und im Lymphknoten, im Thymus, in der Milz und im Blinddarm nachgewiesen.

Die Ratten-cDNA wurde unter Verwendung des Leber-spezifischen ApoE-Promotor-Expressionssystems in transgenen Mäusen exprimiert (Beispiel 3). Eine Analyse von Expressoren zeigte eine deutliche Zunahme der Knochendichte, insbesondere in Röhrenknochen (Oberschenkel), Wirbeln und flachen Knochen (Becken). Eine histologische Analyse gefärbter Knochenschnitte zeigte eine schwere Osteopetrosie (siehe Beispiel 4), wodurch in deutliches Ungleichgewicht zwischen der Knochenbildung und der Resorption angezeigt wird, das zu einer deutlichen Akkumulation von Knochen und Knorpel geführt hat. Eine Verringerung der Anzahl von trabekulären Osteoklasten in den Knochen von OPG-Expressortieren zeigt, daß ein signifikanter Teil der Aktivität des TNFR-verwandten Proteins auf die Verhinderung der Knochenresorption entfallen kann, wobei es sich hier um einen Vorgang handelt, der durch Osteoklasten vermittelt wird. Angesichts der Aktivität in transgenen Expressoren werden die vorliegend beschriebenen TNFR-verwandten Proteine als OPGs bezeichnet.

Unter Verwendung der Ratten-cDNA-Sequenz wurden murine und humane cDNA-Klone isoliert (Beispiel 5). Die Expression des murinen OPGs in 293-Zellen und des humanen OPGs in E. coli wird in den Beispielen 7 und 8 beschrieben. Das murine OPG wurde in Form eines Fc-Fusionsproteins produziert, welches durch Protein A-Affinitätschromatographie gereinigt wurde. Ferner wird im Beispiel 7 die Expression von humanen und murinen OPG-Polypeptiden in CHO- und 293-Zellen in vollständiger Länge und in verkürzter Form entweder als Fusionspolypeptide mit der Fc-Region von humanem IgG1 oder als unfusionierte Polypeptide beschrieben. Die Expression von humanen und murinen OPGs in vollständiger Länge und in verkürzter Form in E. coli entweder als Fc-Fusionspolypeptide oder als unfusionierte Polypeptide wird in Beispiel 8 beschrieben. Die Reinigung von rekombinant produziertem Säuger- und Bakterien-OPG wird in Beispiel 10 beschrieben.

Die biologische Aktivität von OPG wurde ermittelt unter Anwendung eines in vitro-Assays der Osteoklastenreifung, eines in vivo-Modells für durch Interleukin-1 (IL-1) induzierte Hyperkalzämie, sowie durch Injektionsstudien über die Knochendichte in normalen Mäusen (siehe Beispiel 11). Die folgenden, in CHO- oder 293-Zellen produzierten rekombinanten OPG-Proteine zeigten Aktivität in dem in vitro-Assay der Osteoklastenreifung: muOPG [22-185]-Fc, muOPG [22-194]-Fc, muOPG [22-401]-Fc, muOPG [22-401], huOPG [22-201]-Fc, huOPG [22-401]-Fc. Das in CHO-Zellen produzierte muOPG [22-180]-Fc sowie das in E. coli produzierte huOPG met[32-401] zeigten in dem in vitro-Assay keine Aktivität.

OPG aus verschiedenen Quellen wurde als Dimer und in einem gewissen Ausmaß als höheres Multimer produziert. Das in transgenen Mäusen produzierte Ratten-OPG [22-401], die als rekombinante Polypeptide in CHO-Zellen produzierten muOPG [22-401] und huOPG [22-401], sowie das OPG, welches als natürlicherweise auftretendes Produkt von einer zytotoxischen T-Zelllinie exprimiert wurde, zeigten sich bei Analyse in nicht-reduzierenden SDS-Gelen vorherrschend als Dimere und Trimere (siehe Beispiel 9). Verkürzte OPG-Polypeptide mit Deletionen in der Region der Aminosäuren 186-401 (z. B. OPG [1-185] und OPG [1-194]) lagen vorherrschend in monomerer Form vor, was darauf hinweist, daß die Region 186-401 bei der Selbstorganisation von OPG-Polypeptiden beteiligt sein kann. Das in E. coli produzierte huOPG met[32-401] lag jedoch in großem Umfang in monomerer Form vor.

OPG kann bei der Steuerung der Knochenresorption wichtig sein. Das Protein scheint als ein löslicher Rezeptor der TNF-Familie zu wirken, und es kann eine beim osteolytischen Stoffwechselweg involvierte Rezeptor/Liganden-Wechselwirkung verhindern. Ein Aspekt der Steuerung scheint eine Verringerung der Anzahl an Osteoklasten zu sein.

Nukleinsäuren

Durch die Erfindung wird eine isolierte Nukleinsäure bereitgestellt, die für ein Polypeptid kodiert, welches mindestens eine der biologischen Aktivitäten von OPG aufweist. Im Rahmen der vorliegenden Beschreibung schließen die biologischen Aktivitäten von OPG jede den Knochenstoffwechsel betreffende Aktivität und insbesondere die Erhöhung der Knochendichte ein, sind aber nicht hierauf beschränkt. Die erfundungsgemäßen Nukleinsäuren werden ausgewählt aus den folgenden Gruppen:

- a) Nukleinsäuresequenzen gemäß Darstellung in den Fig. 2B—2C (SEQ ID NO: 120), 9A—9B (SEQ ID NO: 122) und 9C—9D (SEQ ID NO: 124), oder komplementäre Strände derselben;
- b) Nukleinsäuren, die unter stringenten Bedingungen mit der Polypeptid-kodierenden Region in den Fig. 2B—2C (SEQ ID NO: 120), 9A—9B (SEQ ID NO: 122), und 9C—9D (SEQ ID NO: 124) hybridisieren;
- c) Nukleinsäuren, die unter stringenten Bedingungen mit den in Fig. 1A dargestellten Nukleotiden 148 bis 337 einschließlich hybridisieren; und
- d) Nukleinsäuresequenzen, die gegenüber den Sequenzen gemäß (a) und (b) degenriert sind.

DE 196 54 610 A1

Durch die Erfindung werden Nukleinsäuren, die für OPG der Ratte, der Maus und des Menschen kodieren, als auch damit hybridisierende Nukleinsäuresequenzen bereitgestellt, welche für ein Polypeptid kodieren, das mindestens eine der biologischen Aktivitäten von OPG aufweist. Ferner werden Nukleinsäuren bereitgestellt, die mit einem OPG-EST der Ratte hybridisieren, welcher die in Fig. 1A dargestellten Nukleotide 148–337 umfaßt. Die Hybridisierungsbedingungen sind im allgemeinen von hoher Stringenz wie SXSSC, 50% Formamid und 42°C, wie in Beispiel 1 der Beschreibung beschrieben wird. Eine diesen Bedingungen gleichwertige Stringenz kann durch Einstellung der Konzentrationen an Salz und organischem Lösungsmittel sowie der Temperatur leicht erreicht werden. Die Nukleinsäuren in (b) umfassen Sequenzen, die für OPG-verwandte Polypeptide kodieren, welche mit anderen bekannten Vertretern der TNF-Rezeptor-Superfamilie keine nachweisbare Hybridisierung eingehen. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Nukleinsäuren wie in den Fig. 2B–2C (SEQ ID NO: 120), 9A–9B (SEQ ID NO: 122) und 9C–9D (SEQ ID NO: 124) dargestellt.

Die Länge der erfundungsgemäßen hybridisierenden Nukleinsäuren kann variabel sein, da die Hybridisierung in einem Teil oder in dem gesamten Bereich der Polypeptidkodierenden Regionen gemäß Darstellung in den Fig. 2B–2C (SEQ ID NO: 120), 9A–9B (SEQ ID NO: 122), und 9C–9D (SEQ ID NO: 124), und auch in benachbarten nicht-kodierenden Regionen stattfinden kann. Daher können hybridisierende Nukleinsäuren Verkürzungen oder Extensionen der in den Fig. 2B–2C (SEQ ID NO: 120), 9A–9B (SEQ ID NO: 122), und 9C–9D (SEQ ID NO: 124) dargestellten Sequenzen sein. Verkürzte oder verlängerte Nukleinsäuren werden erfundungsgemäß unter der Voraussetzung umfaßt, daß sie für ein Polypeptid kodieren, welches eine oder mehrere der biologischen Eigenschaften von OPG beibehält. Die hybridisierenden Nukleinsäuren können auch benachbarte nicht-kodierende Regionen einschließen, die 5' und/oder 3' von der für OPG kodierenden Region liegen. Die nichtkodierenden Regionen schließen regulatorische Regionen ein, die bei der Expression von OPG beteiligt sind, wie Promotoren, Enhancer, translationale Initiationsstellen, Transkriptionsterminationsstellen und dergleichen.

Eine Beschreibung der Hybridisierungsbedingungen für Nukleinsäuren liefern Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

Die für das OPG der Ratte kodierende DNA wurde im Plasmid pMO-B1.1 bereitgestellt, welches am 27. Dezember 1995 unter der ATCC-Zugriffsnr. 69970 bei der American Type Culture Collection, Rockville, MD, hinterlegt wurde. Die für das OPG der Maus kodierende DNA wurde im Plasmid pRcCMV-murine OPG bereitgestellt, welches am 27. Dezember 1995 unter der Zugriffsnr. 69971 bei der American Type Culture Collection, Rockville, MD, hinterlegt wurde. Die für humanes OPG kodierende DNA wurde im Plasmid pRcCMV-human OPG bereitgestellt, welches am 27. Dezember 1995 unter der Zugriffsnr. 69969 bei der American Type Culture Collection, Rockville, MD, hinterlegt wurde. Die erfundungsgemäßen Nukleinsäuren hybridisieren unter stringenten Bedingungen mit den DNA-Inserts mit den ATCC-Zugriffsnr. 69969, 69970 und 69971 und weisen mindestens eine der biologischen Aktivitäten von OPG auf.

Ferner werden durch die Erfindung Derivate der Nukleinsäuresequenzen gemäß Darstellung in Fig. 2B, 9A und 9B bereitgestellt. Im Rahmen der vorliegenden Beschreibung schließen Derivate Nukleinsäuresequenzen mit Addition, Substitution, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Resten ein, so daß die resultierenden Sequenzen für Polypeptide kodieren, bei denen ein oder mehrere Aminosäurereste hinzugefügt, deletiert, insertiert oder substituiert worden sind, und das resultierende Polypeptid die Aktivität von OPG aufweist. Die Nukleinsäurederivate können natürlicherweise auftreten, wie durch Spleißvariation oder Polymorphismus, oder sie können unter Anwendung von dem Fachmann zur Verfügung stehenden Techniken zur ortsspezifischen Mutagenese hergestellt werden. Ein Beispiel für eine natürlicherweise auftretende Variante von OPG ist eine Nukleinsäure, die innerhalb der Leadersequenz am Rest 3 einen Wechsel von Lys zu Asn kodiert (s. Beispiel 5). Es wird davon ausgegangen, daß die Nukleinsäurederivate für Aminosäureveränderungen in Regionen des Moleküls kodieren, bei denen es am wenigsten wahrscheinlich ist, daß sie die biologische Aktivität beeinträchtigen. Andere Derivate schließen eine Nukleinsäure ein, die für eine membrangebundene Form von OPG kodiert, welche eine extrazelluläre Domäne gemäß Darstellung in den Fig. 2B–2C (SEQ ID NO: 120), 9A–9B (SEQ ID NO: 122), und 9C–9D (SEQ ID NO: 124) zusammen mit zytoplasmatischen und Transmembrandomänen aufweist.

Nach einer Ausführungsform schließen Derivate von OPG Nukleinsäuren ein, die für verkürzte Formen von OPG kodieren, bei denen eine oder mehrere Aminosäuren vom Carboxyterminus deletiert sind. Beim OPG können vom Carboxyterminus 1 bis 216 Aminosäuren deletiert sein. Fakultativ kann sich der neue Carboxyterminus um eine Fc-Region eines Antikörpers verlängern, um ein biologisch aktives OPG-Fc-Fusionspolypeptid zu ergeben. (Vgl. Beispiel 11). In bevorzugten Ausführungsformen kodieren Nukleinsäuren für ein OPG mit der Aminosäuresequenz der Reste 22–185, 22–189, 22–194 oder 22–201 (gemäß Darstellung in Fig. 9E–F), und kodieren fakultativ für eine Fc-Region von humanem IgG.

Ferner sind Nukleinsäuren eingeschlossen, die für verkürzte Formen von OPG kodieren, bei denen eine oder mehrere Aminosäuren vom Aminoterminus deletiert sind. Verkürzte Formen schließen solche ein, denen ein Teil oder sämtliche der die Leadersequenz umfassenden 21 Aminosäuren fehlt. Zusätzlich werden durch die Erfindung Nukleinsäuren bereitgestellt, die für ein OPG kodieren, bei dem 1 bis 10 Aminosäuren vom reifen Aminoterminus (am Rest 22) und, fakultativ, 1 bis 216 Aminosäuren vom Carboxyterminus (am Rest 401) deletiert sind. Fakultativ können die Nukleinsäuren für einen Methioninrest am Aminoterminus kodieren. Beispiele für solche verkürzten OPG-Polypeptide sind in Beispiel 8 beschrieben.

Beispiele für die erfundungsgemäßen Nukleinsäuren schließen cDNA, genomische DNA, synthetische DNA und RNA ein. Die cDNA wird aus Bibliotheken erhalten, die ausgehend von mRNA hergestellt wurden, welche aus vielfältigen, OPG exprimierenden Geweben isoliert wurde. Bei Menschen schließen die Gewebequellen für OPG die Niere, die Leber, die Plazenta und das Herz ein. Die für OPG kodierende genomische DNA wird aus

genomischen Bibliotheken erhalten, die von einer Vielzahl von Spezies im Handel erhältlich sind. Synthetische DNA wird erhalten durch chemische Synthese von überlappenden Oligonukleotidfragmenten und nachfolgende Zusammenlagerung der Fragmente zur Rekonstitution eines Teils oder der Gesamtheit der kodierenden Region und flankierenden Sequenzen (siehe US-Patent Nr. 4 695 623, welches die chemische Synthese von Interferongenen beschreibt). RNA wird am einfachsten durch prokaryontische Expressionsvektoren erhalten, von denen große Mengen an mRNA synthetisiert werden, wie durch Vektoren, die T7-Promotoren und RNA-Polymerase nutzen.

Die erfundungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen werden verwendet zum Nachweis von OPG-Sequenzen in biologischen Proben, um festzustellen, in welchen Zellen und Geweben OPG-mRNA exprimiert wird. Die Sequenzen können auch eingesetzt werden, um genomicsche und cDNA-Bibliotheken nach Sequenzen abzusuchen, die mit OPG verwandt sind. Ein Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet verfügt über die Fähigkeit zum Nachweis homologer Sequenzen durch Screening und Anwendung geeigneter Hybridisierungsbedingungen. Die Nukleinsäuren sind ferner geeignet zum Modulieren der OPG-Expressionsrate durch Antisense- oder Gentherapie. Die Nukleinsäuren werden ferner eingesetzt zur Entwicklung von transgenen Tieren, die für die Herstellung des Polypeptids und für die Untersuchung der biologischen Aktivität eingesetzt werden können (siehe Beispiel 3).

Vektoren und Wirtszellen

Durch die Erfahrung werden ferner Expressionsvektoren, die für OPG kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, sowie Wirtszellen, die mit den Vektoren transformiert sind, und Verfahren zur Herstellung von OPG bereitgestellt. Ein Überblick über die Expression von rekombinanten Proteinen liefert Methods of Enzymology Vol. 185, D.V. Goeddel (Hrsg.), Academic Press (1990).

Wirtszellen für die Herstellung von OPG schließen prokaryontische Wirtszellen wie E. coli, sowie Hefe-, Pflanzen-, Insekten- und Säuger-Wirtszellen ein. Zur Expression sind E. coli-Stämme wie HB101 oder JM101 geeignet. Bevorzugte Säuger-Wirtszellen schließen COS-, CHO D-, 293-, CV-1-, 3T3-, baby hamster kidney (BHK)-Zellen und andere ein. Säuger-Wirtszellen sind bevorzugt, wenn posttranskriptionale Modifikationen wie eine Glykosylierung und ein Polypeptid-Processing für die OPG-Aktivität wichtig sind. Die Säuger-Expression ermöglicht die Produktion von sezernierten Polypeptiden, die aus dem Wachstumsmedium rückgewonnen werden können.

Die Vektoren für die Expression von OPG enthalten wenigstens Sequenzen, die für die Vermehrung des Vektors und für die Expression des klonierten Inserts erforderlich sind. Diese Sequenzen schließen einen Replikationsursprung, Selektionsmarker, Promotoren, Ribosomenbindungsstellen, Enhancer-Sequenzen, RNA-Spleißstellen und Transkriptionsterminationsstellen ein. Vektoren, die für die Expression in den zuvor genannten Wirtszellen geeignet sind, sind leicht erhältlich, und die erfundungsgemäßen Nukleinsäuren werden unter Anwendung von Standardverfahren der rekombinanten DNA-Technologie in die Vektoren insertiert. Vektoren für die Gewebe-spezifische Expression von OPG sind ebenfalls eingeschlossen. Solche Vektoren schließen Promotoren, die für eine Produktion in Mäusen spezifisch in der Leber, der Niere oder in anderen Organen funktionieren, und virale Vektoren für die Expression von OPG in targetierten humanen Zellen ein.

Unter Anwendung eines geeigneten Wirt-Vektor-Systems wird OPG rekombinant produziert, indem man eine Wirtszelle, die mit einem Expressionsvektor transformiert ist, der Nukleinsäuresequenzen enthält, welche für OPG kodieren, unter Bedingungen derart kultiviert, daß OPG gebildet wird, und man das Expressionsprodukt isoliert. OPG wird im Überstand von transfizierten Säugerzellen oder in Einschlußkörpern von transformierten bakteriellen Wirtszellen produziert. Das auf diese Weise gebildete OPG kann durch dem Fachmann bekannte und im nachfolgenden beschriebene Verfahren gereinigt werden. Die Expression von OPG in Säuger- und Bakterien-Wirtssystemen wird in den Beispielen 7 und 8 beschrieben. Die Expressionsvektoren für Säugervirte werden beispielsweise durch Plasmide wie das in der PCT-Anmeldung Nr. 90/14363 beschriebene pDSRα repräsentiert. Expressionsvektoren für bakterielle Wirtszellen werden beispielsweise durch die in Beispiel 8 beschriebenen Plasmide pAMG21 und pAMG22-His repräsentiert. Das Plasmid pAMG21 wurde am 24. Juli 1996 unter der Zugriffsnr. 98113 bei der American Type Culture Collection, Rockville, MD, hinterlegt. Das Plasmid pAMG22-His wurde am 24. Juli 1996 unter der Zugriffsnr. 98112 bei der American Type Culture Collection, Rockville, MD, hinterlegt. Es ist davon auszugehen, daß die beschriebenen spezifischen Plasmide und Wirtszellen der Veranschaulichung dienen, und daß für die Expression der Polypeptide gleichermaßen auch andere erhältliche Plasmide und Wirtszellen eingesetzt werden können.

Die Erfahrung ermöglicht ferner die Expression von OPG durch endogene Nukleinsäuren durch in vivo- oder ex vivo-Rekombinationsereignisse, um eine Modulation von OPG auf der Ebene des Wirtschromosoms zu ermöglichen. Die Expression von OPG durch Einführung von exogenen regulatorischen Sequenzen (z. B. Promotoren oder Enhancer), die in der Lage sind, die Produktion von OPG von endogenen, für OPG kodierenden Regionen zu steuern, ist ebenfalls umfaßt. Durch die Erfahrung wird schließlich auch die Stimulierung von endogenen regulatorischen Sequenzen ermöglicht, die in der Lage sind, die Produktion von OPG zu steuern (z. B. durch Exposition mit Faktoren, die die Transkription verstärken).

Polypeptide

Durch die Erfahrung wird OPG bereitgestellt, das ein neuer Vertreter der TNF-Rezeptor-Superfamilie ist und eine mit dem Knochenstoffwechsel assoziierte Aktivität sowie insbesondere die Aktivität aufweist, die Knochenresorption zu inhibieren und dadurch die Knochendichte zu erhöhen. OPG bezieht sich auf ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz vom OPG der Maus, der Ratte oder des Menschen, oder auf ein Derivat davon mit

mindestens einer der biologischen Aktivitäten von OPG. Die Aminosäuresequenzen vom OPG der Ratte, der Maus und des Menschen sind in den Fig. 2B—2C (SEQ ID NO: 121), 9A—9B (SEQ ID NO: 123) bzw. 9C—9D (SEQ ID NO: 125) dargestellt. Ein Derivat von OPG bezieht sich auf ein Polypeptid mit einer Addition, Deletion, Insertion oder Substitution von einer oder mehreren Aminosäuren, w bei das resultierende Polypeptid mindestens eine der biologischen Aktivitäten von OPG aufweist. Die biologischen Aktivitäten von OPG schließen Aktivitäten ein, die beim Knochenstoffwechsel beteiligt sind, sind aber nicht hierauf beschränkt. Vorzugsweise ist bei den Polypeptiden die aminoterminale Leadersequenz von 21 Aminosäuren entfernt.

Die erfindungsgemäß eingeschlossenen OPG-Polypeptide schließen rat [1-401], rat [22-180], rat [22-401], rat [22-401]-Fc-Fusion, rat [1-180]-Fc-Fusion, mouse [1-401], mouse [1-180], mouse [22-401], human [1-401], mouse [22-180], human [22-401], human [1-180], human [22-180]-Fc-Fusion, und human met[32-401] ein. Die Bezeichnung der Aminosäuren erfolgt gemäß Darstellung in SEQ ID NO: 121 (rat), SEQ ID NO: 123 (mouse) und SEQ ID NO: 125 (human). Ebenfalls eingeschlossen sind Polypeptidderivate mit Deletionen oder carboxyterminalen Verkürzungen eines Teils oder sämtlicher Aminosäurereste 180—401 von OPG; Veränderungen einer oder mehrerer Aminosäuren in den Resten 180—401; Deletion eines Teils oder des gesamten Bereichs der Cystein-reichen Domäne von OPG, insbesondere mit einer Deletion der distalen (carboxyterminalen) Cystein-reichen Domäne; und mit Veränderungen einer oder mehrerer Aminosäuren in einer Cystein-reichen Domäne, insbesondere in der distalen (carboxyterminalen) Cystein-reichen Domäne. Nach einer Ausführungsform sind beim OPG 1 bis etwa 216 Aminosäuren vom Carboxyterminus deletiert. Nach einer anderen Ausführungsform sind beim OPG 1 bis etwa 10 Aminosäuren vom reifen Aminoterminal (wobei sich der reife Aminoterminal am Rest 22 befindet) und, fakultativ, 1 bis etwa 216 Aminosäuren vom Carboxyterminus deletiert.

Zusätzliche OPG-Polypeptide, die erfindungsgemäß umfaßt sind, schließen die folgenden ein: human [22-180]-Fc-Fusion, human [22-201]-Fc-Fusion, human [22-401]-Fc-Fusion, mouse [22-185]-Fc-Fusion, mouse [22-194]-Fc-Fusion. Diese Polypeptide werden in Säuger-Wirtszellen wie CHO- oder 293-Zellen produziert. Zusätzliche OPG-Polypeptide, die erfindungsgemäß umfaßt sind und in prokaryontischen Wirtszellen exprimiert werden, schließen die folgenden ein: human met[22-401] Fc-human met[22-401]-Fusion (die Fc-Region ist fusioniert am Aminoterminal der für OPG kodierenden Sequenz vollständiger Länge gemäß Beschreibung in Beispiel 8), human met[22-401]-Fc-Fusion (die Fc-Region ist mit der vollständigen OPG-Sequenz fusioniert), Fc-mouse met[22-401]-Fusion, mouse met[22-401]-Fc-Fusion, human met[27-401], human met[22-185], human met[22-189], human met[22-194], human met[22-194] (P25A), human met[22-194] (P26A), human met[27-185], human met[27-189], human met[27-194], human met[22-401], human met-lys [22-401], human met-lys [22-401], human met-(lys)₃[22-401], human met[22-401]-Fc (P25A), human met[22-401] (P26A), human [22-401] (P26D), mouse met[22-401], mouse met[27-401], mouse met[32-401], mouse met[27-180], mouse met[22-189], mouse met[22-194], mouse met[27-189], mouse met[27-194], mouse met-lys[22-401], mouse HEK[22-401] (A45T), mouse met-lys-(his)[22-401], mouse met-lys[22-401]-(his), und mouse met[27-401] (P33E, G36S, A456P). Es wird davon ausgegangen, daß die obigen, in prokaryontischen Wirtszellen produzierten OPG-Polypeptide einen aminoterminalen Methioninrest aufweisen, sofern ein solcher Rest nicht angegeben ist. In spezifischen Beispielen wurden OPG-Fc-Fusionsproteine hergestellt unter Verwendung einer 227 Aminosäuren umfassenden Region des humanen IgG1-y1 mit der Sequenz gemäß Darlegung von Ellison et al. (Nuc. Acids Res. 10, 4071—4079 (1982)). Es können jedoch gleichermaßen auch Varianten der Fc-Region vom humanen IgG verwendet werden.

Die Analyse der biologischen Aktivität von carboxyterminal verkürzten OPG-Formen, die mit der Fc-Region vom humanen IgG1 fusioniert sind, zeigt, daß ein Teil von OPG von etwa 164 Aminosäuren für die Aktivität erforderlich ist. Diese Region umfaßt die Aminosäuren 22—185, vorzugsweise solche gemäß Fig. 9C—9D (SEQ ID NO: 125), und umfaßt vier Cystein-reiche Domänen, die für die Cystein-reichen Domänen von extrazellulären TNFR-Domänen charakteristisch sind.

Unter Nutzung der Homologie zwischen OPG und den extrazellulären Liganden-Bindungsdomänen von Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Familie wurde auf Basis der bekannten Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von TNFR-I ein dreidimensionales Modell von OPG erstellt (siehe Beispiel 6). Dieses Modell wurde zum Identifizieren von solchen Resten innerhalb von OPG eingesetzt, die für die biologische Aktivität wichtig sein können. Es wurden Cysteinreste identifiziert, die bei der Aufrechterhaltung der Struktur der vier Cystein-reichen Domänen beteiligt sind. Anhand des Modells wurden die folgenden Disulfidbindungen identifiziert: Domäne 1: cys41 bis cys54 cys44 bis cys62, tyr23 und his66 können an der Stabilisierung der Struktur dieser Domäne beteiligt sein; Domäne 2: cys65 bis cys80, cys83 bis cys98, cys87 bis cys105; Domäne 3: cys107 bis cys118, cys124 bis cys142; Domäne 4: cys145 bis cys160, cys166 bis cys185. Ferner wurden Reste identifiziert, die sich in unmittelbarer Nähe zum TNF β befinden, wie in den Fig. 11 und 12A—12B dargestellt ist. Bei diesem Modell wird angenommen, daß OPG an einen korrespondierenden Liganden bindet; TNF β wurde als Modellligand eingesetzt, um die Wechselwirkung zwischen OPG und seinem Liganden zu simulieren. Auf der Grundlage dieses Modells können die folgenden Reste in OPG für die Ligandenbindung wichtig sein: glu34, lys43, pro66 bis gln91 (insbesondere pro66, his68, tyr69, tyr70 thr71, asp72, ser73, his76, ser77, asp78, glu79, leu81, tyr82, pro85, val86, lys88, glau90 und gln91), glu153 und s r155.

Veränderungen in diesen Aminosäureresten können die biologische Aktivität von OPG entweder allein oder in Kombination verändern. Beispielsweise können Veränderungen in spezifischen Cysteinresten zu einer Veränderung der Struktur einzelner Cystein-reicher Domänen führen, wohingegen Veränderungen in Resten, die für die Ligandenbindung wichtig sind, die physikalischen Interaktionen zwischen OPG und Ligand beeinflussen können. Strukturmodelle können das Identifizieren von Analogen unterstützen, die über weitere wünschenswerte Eigenschaften wie eine erhöhte biologische Aktivität, größere Stabilität, oder einfache Formulierung aufweisen.

Durch die Erfindung wird auch ein OPG-Monomere umfassendes OPG-Multimer bereitgestellt. OPG scheint

DE 196 54 610 A1

als Multimer aktiv zu sein (z. B. Dimer, Trimer oder in h⁻here Anzahl von Monomeren). Vorzugsweise sind OPG-Multimere Dimere oder Trimere. OPG-Multimere können Monomere umfassen, welche die Aminosäuresequenz von OPG in ausreichendem Umfang aufweisen, um die Multimerbildung zu fördern, oder sie können Monomere umfassen, die heterologe Sequenzen aufweisen, wie eine Fc-Antikörperferrregion. Eine Analyse der carboxyterminalen Deletionen von OPG legt nahe, daß mindestens ein Teil der Region 186-401 bei der Assoziation von OPG-Polypeptiden beteiligt ist. Eine Substitution eines Teils oder der Gesamtheit der Region der OPG-Aminosäuren 186 - 401 durch eine zur Selbstorganisation fähige Aminosäuresequenz wird von der Erfindung ebenfalls umfaßt. Alternativ können die OPG-Polypeptide oder Derivate derselben modifiziert werden, um Dimere oder Multimere zu bilden, durch ortsgerechte Mutagenese, um ungepaarte Cysteinreste für die Ausbildung einer Interketten-Disulfidbindung zu schaffen, durch photochemisches Vernetzen, wie durch Exposition mit UV-Licht, oder durch chemisches Vernetzen mit bifunktionellen Linker-Molekülen wie bifunktionelles Polyethylenglykol und dergleichen.

Die Modifikationen von OPG-Polypeptiden werden erfundungsgemäß umfaßt und schließen posttranskriptionale Modifikationen (z. B. N-verknüpfte oder O-verknüpfte Kohlenstoffketten, prozessierend von N-terminalen oder C-terminalen Enden), das Anheften von chemischen Resten an das Aminosäurerückgrat, chemische Modifikationen von N-verknüpften oder O-verknüpften Kohlenhydratkettchen, und die Addition eines N-terminalen Methioninrests als Ergebnis der prokaryontischen Wirtszellexpression ein. Die Polypeptide können auch mit einem nachweisbaren Marker wie einem enzymatischen, fluoreszierenden, radioaktiven oder Affinitätsmarker modifiziert sein, um den Nachweis und die Isolierung des Proteins zu ermöglichen.

Weitere Modifikationen von OPG schließen chimaäre Proteine ein, bei denen OPG mit einer heterologen Aminosäuresequenz fusioniert ist. Die heterologe Sequenz kann irgendeine Sequenz sein, die dem resultierenden Fusionsprotein die Beibehaltung der Aktivität von OPG erlaubt. Die heterologen Sequenzen schließen z. B. Immunglobulinfusionen wie Fc-Fusionen ein, welche die Reinigung des Proteins erleichtern können. Eine heterologe Sequenz, welche die Assoziation von OPG-Monomeren zur Bildung von dimeren, trimeren und anderen höheren multimeren Formen fördert, ist bevorzugt.

Die erfundungsgemäßen Polypeptide werden von anderen in Geweben, Zelllinien und transformierten Wirtszellen, die OPG exprimieren, vorhandenen Polypeptiden isoliert und gereinigt, oder sie werden von Komponenten in Zellkulturen gereinigt, die das sezernierte Protein enthalten. Nach einer Ausführungsform ist das Polypeptid frei von einer Assoziation mit anderen humanen Proteinen, wie das Expressionsprodukt einer bakteriellen Wirtszelle.

Durch die Erfindung werden ferner chemisch modifizierte Derivate von OPG bereitgestellt, die zusätzliche Vorteile wie eine erhöhte Stabilität und Zirkulierungsdauer des Polypeptids oder eine verminderte Immunogenität bieten können (siehe US-Patent Nr. 4 179 337). Die chemischen Reste für die Derivatisierung können ausgewählt werden aus wasserlöslichen Polymeren wie Polyethylenglykol, Ethylenglykol/Propylenglykol-Copolymeren, Carboxymethylcellulose, Dextran, Polyvinylalkohol und dergleichen. Die Polypeptide können an zufälligen Positionen innerhalb des Moleküls oder an vorbestimmten Positionen innerhalb des Moleküls verändert werden und schließen einen, zwei, drei oder mehrere angeheftete chemische Reste ein.

Das Polymer kann irgendein Molekulargewicht aufweisen und verzweigt oder unverzweigt sein. Im Falle von Polyethylenglykol liegt das für eine leichtere Handhabung und Verarbeitung bevorzugte Molekulargewicht zwischen etwa 1 kD und etwa 100 kD (der Begriff "etwa" gibt an, daß einige Moleküle in Polyethylenglykol-Präparationen ein höheres und einige ein niedrigeres Molekulargewicht als das angegebene Molekulargewicht aufweisen).

Andere Größen können in Abhängigkeit von dem gewünschten therapeutischen Profil eingesetzt werden (z. B. der erwünschten Dauer einer anhaltenden Freisetzung, den Effekten, sofern vorhanden, auf die biologische Aktivität, der Einfachheit der Handhabung, dem Ausmaß oder dem Fehlen einer Antigenität und von anderen bekannten Effekten des Polyethylenglykols auf ein therapeutisches Protein oder Analog).

Das Anheften der Polyethylenglykolumoleküle (oder anderer chemischer Reste) an das Protein sollte unter Berücksichtigung der Effekte auf funktionelle oder antigene Domänen des Proteins erfolgen. Dem Fachmann stehen eine Reihe von Verfahren zur Anheftung zur Verfügung, z. B. EP 0 401 384, vorliegend durch Bezugnahme eingeschlossen (Kopplung von PEG an G-CSF), siehe auch Maliget al., Exp. Hematol. 20: 1028 - 1035 (1992) (Beschreibung der Pegylierung von GM-CSF unter Verwendung von Tresylchlorid). Beispielsweise kann das Polyethylenglykol durch Aminosäurereste über eine reaktive Gruppe wie eine freie Amino- oder Carboxylgruppe kovalent gebunden werden. Reaktive Gruppen sind solche, an die ein aktiviertes Polyethylenglykolumolekül gebunden werden kann. Die Aminosäurereste mit einer freien Aminogruppe können Lysinreste und die N-terminalen Aminosäurereste einschließen; solche, die eine freie Carboxylgruppe aufweisen, können Asparaginsäurereste, Glutaminsäurereste und die C-terminalen Aminosäurenreste einschließen. Sulfhydrylgruppen können für die Anheftung des bzw. der Polyethylenglykolumoleküle auch als reaktive Gruppe verwendet werden. Für therapeutische Zwecke ist die Anheftung an eine Aminogruppe wie die Anheftung an den N-Terminus oder eine Lysingruppe bevorzugt.

Ein N-terminal chemisch modifiziertes Protein kann besonders erwünscht sein. Unter Verwendung von Polyethylenglykol als veranschaulichendes Beispiel der vorliegenden Zusammensetzungen kann man auswählen aus einer Vielzahl von Polyethylenglykolumolekülen (durch Molekulargewicht, Verzweigung, etc.) das Verhältnis zwischen Polyethylenglykolumolekülen und Protein- (oder Peptid-)Molekülen in der Reaktionsmischung, den anzuwendenden Typ d r PEGylierungsreaktion, und das Verfahren zum Erhalt des ausgewählten N-terminal pegyierten Proteins. Das Verfahren zum Erhalt der N-terminal pegyierten Präparation (d. h. das gegebenenfalls erforderliche Abtrennen dieses Rests von anderen monopegyierten Resten) kann durch Reinigung des N-terminal pegyierten Materials aus einer Population von pegyierten Proteinmolekülen erfolgen. Eine selektive, N-terminale chemische Modifikation kann erfolgen durch reduktive Alkylierung unter Ausnutzung der unter-

schiedlichen Reaktivitäten von verschiedenen Typen primärer Aminogruppen (Lysin gegenüber dem N-Terminus), die für die Derivatisierung in einem bestimmten Protein zur Verfügung stehen. Unter den geeigneten Reaktionsbedingungen wird eine im wesentlichen selektive Derivatisierung des Proteins am N-Terminus mit einer ein Polymer enthaltenden Carbonylgruppe erreicht.

Synthetische OPG-Dimere können anhand zahlreicher Vorgehensweisen zur chemischen Quervernetzung hergestellt werden. OPG-Monomere können in jedweder Art und Weise chemisch verknüpft werden, sofern die biologische Aktivität von OPG beibehalten oder verstärkt wird. Eine Vielzahl von chemischen Vernetzungsmitteln kann in Abhängigkeit von den gewünschten Eigenschaften des Proteindimers eingesetzt werden. Beispielsweise können Vernetzungsmittel kurz und relativ starr oder länger und flexibler sein, und sie können biologisch reversibel sein, und sie können eine reduzierte Immunogenität oder eine längere pharmakokinetische Halbwertszeit aufweisen.

In einem Beispiel werden OPG-Moleküle unter Anwendung einer zweistufigen Synthese über den Aminoterminus verknüpft (siehe Beispiel 12). In der ersten Stufe wird OPG chemisch am Aminoterminus modifiziert, um ein geschütztes Thiol einzufügen, welches nach Reinigung entschützt wird und als Anheftungspunkt für eine ortsspezifische Konjugation über eine Vielzahl von Vernetzern mit einem zweiten OPG-Molekül dient. Amino-terminal Vernetzungen schließen eine Disulfidbindung, Thioether-Verknüpfungen unter Verwendung kurzkettiger, bifunktioneller aliphatischer Vernetzungsmittel, und Thioether-Verknüpfungen mit bifunktionellen Polyethylenglykol-Vernetzern variabler Länge (PEG "Dumbbells") ein, sind aber nicht hierauf beschränkt. Von der PEG-Dumbbell-Synthese von OPG-Dimeren ebenfalls umfaßt ist ein Nebenprodukt einer solchen Synthese mit der Bezeichnung "Monobell". Ein OPG-Monobell besteht aus einem Monomer, welches mit einem linearen bifunktionellen PEG mit einem freien Polymerterminus gekoppelt ist. Alternativ kann OPG direkt durch eine Vielzahl von aminspezifischen homobifunktionellen Vernetzungstechniken vernetzt werden, welche Reagenzien einschließen wie: Diethylentriaminpentaacetedianhydrid (DTPA), p-Benzochinon (pBQ) oder Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS³), wie auch andere im Stand der Technik bekannte Mittel. Das direkte Versehen von OPG mit einer Thiolgruppe ist auch möglich mit Reagenzien wie Iminothiolan in Gegenwart einer Vielzahl von bifunktionellen, thiolspezifischen Vernetzungsmitteln, wie PEG-bis-maleimid, wodurch eine Dimerisierung und/oder Dumbbells in einem einstufigen Verfahren erzielt werden.

Ein Verfahren zur Reinigung von OPG aus natürlichen Quellen und aus transfizierten Wirtszellen ist ebenfalls eingeschlossen. Das Reinigungsverfahren kann die Anwendung eines oder mehrerer standardisierter Proteinreinigungsschritte in sinnvoller Reihenfolge umfassen, um ein gereinigtes Protein zu erhalten. Die Chromatographieschritte können Ionenaustausch, Gelfiltration, hydrophobe Interaktion, Umkehrphasen-, Chromatofokussierungs-, Affinitätschromatographie unter Verwendung eines Anti-OPG-Antikörpers oder Biotin-Streptavidin-Affinitätskomplexes und dergleichen ein.

Antikörper

35

Erfundungsgemäß umfaßt sind ferner Antikörper, die spezifisch an OPG binden. Die Antigene zur Herstellung von Antikörpern können Polypeptide oder Peptide vollständiger Länge sein, die einen Teil der OPG-Sequenz abdecken. Die immunologischen Vorgehensweisen zur Herstellung von gegenüber OPG reaktiven polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern sind dem Fachmann bekannt (siehe z. B. Harlow und Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N.Y. (1988)). Die auf diese Weise hergestellten Antikörper werden unter Anwendung von standardisierten Enzym-gekoppelten Immunoassays hinsichtlich ihrer Bindungsspezifität und Epitoperkennung charakterisiert. Die Antikörper schließen auch chimäre Antikörper mit variablen und konstanten Domänenregionen ein, welche von unterschiedlichen Spezies abgeleitet sind. Nach einer Ausführungsform sind die chimären Antikörper humanisierte Antikörper mit murinen variablen Domänen und humanen konstanten Domänen. Ebenfalls umfaßt sind Regionen, die die Komplementarität bestimmen und auf ein humanes Framework-Segment aufgepropft sind (sogenannte CDR-gepropfte Antikörper). Chimäre und CDR-gepropfte Antikörper werden unter Anwendung von rekombinanten Verfahren hergestellt, die dem Fachmann bekannt sind. Ebenfalls umfaßt sind in Mäusen generierte humane Antikörper.

40

Die erfundungsgemäßen Anti-OPG-Antikörper können als Affinitätsmittel eingesetzt werden, um OPG aus biologischen Proben zu reinigen (siehe Beispiel 10). In einem Verfahren wird der Antikörper an CaBr-aktivierte Sepharose immobilisiert, und eine Säule des Antikörper/Sepharose-Konjugats wird eingesetzt, um OPG aus flüssigen Proben zu entfernen. Die Antikörper werden auch als diagnostische Reagenzien eingesetzt, um OPG in biologischen Proben anhand von nachfolgend beschriebenen Verfahren nachzuweisen und zu quantifizieren.

45

50

55

Pharmazeutische Zusammensetzungen

Durch die Erfindung werden ferner pharmazeutische Zusammensetzungen bereitgestellt, die eine therapeutisch wirksame Menge des erfundungsgemäßen Peptids zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Verdünnungsmittel, Träger, Lösungsvermittler, Emulgator, Konservierungsmittel und/oder Adjuvans umfassen. Der Begriff "therapeutisch wirksam Menge" bezieht sich auf eine Menge, die angesichts eines spezifizierten Zustands und eines bestimmten Verabreichungsweges einen therapeutischen Effekt ausübt. Die Zusammensetzung kann in einer flüssigen oder lyophilisierten Form vorliegen und umfaßt ein Verdünnungsmittel (Tris-, Acetat- oder Phosphatpuffer) mit vielfältigen pH-Werten und Ionenstärken, einen Lösungsvermittler wie Tween oder Polysorbat, Träger wie humanes Serumalbumin oder Gelatine, Konservierungsstoffe wie Thimerosal oder Benzylalkohol, und antioxidative Stoffe wie Ascorbinsäure oder Natriumbisulfit. Ebenfalls eingeschlossen sind Zusammensetzungen, die zur Steigerung der Löslichkeit oder Stabilität mit wasserlöslichen Polymeren modifi-

60

65

ziertes OPG umfassen. Die Zusammensetzungen können für eine kontrollierte Abgabe über einen ausgedehnten Zeitraum auch den Einbau von OPG in Liposomen, Mikroemulsionen, Micellen oder Vesikel umfassen. Ausdrücklich können OPG-Zusammensetzungen den Einbau in polymere Matrices wie Hydrogele, Silikone, Polyethylen, Ethylvinylacetat-Copolymere, oder biologisch abbaubare Polymere umfassen. Beispiele für Hydrogele schließen Polyhydroxyalkylmethacrylate (p-HEMA), Polyacrylamid, Polymethacrylamid, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol und vielfältige Polyelektrolytkomplexe ein. Beispiele für biologisch abbaubare Polymere schließen Polymilchsäure (PLA), Polyglykolsäure (PGA), Copolymere von PLA und PGA, Polyamide und Copolymere von Polyamiden und Polyester ein. Andere Formulierungen zur kontrollierten Freisetzung schließen Mikrokapsel, Mikrokügelchen, makromolekulare Komplexe und polymere Kugelchen ein, die durch Injektion verabreicht werden können.

Die Auswahl einer bestimmten Zusammensetzung wird von einer Reihe von Faktoren abhängen, einschließlich des zu behandelnden Zustandes, des Verabreichungsweges und der gewünschten pharmakokinetischen Parameter. Einen umfassenderen Überblick über Komponenten, die für pharmazeutische Zusammensetzungen geeignet sind, liefert Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. Ausgabe, A.R. Gennaro (Hrsg.), Hrsg. Mack, Easton, PA (1980).

Die erfundungsgemäßen Zusammensetzungen können durch Injektion, entweder subkutan, intravenös oder intramuskulär, oder durch orale, nasale, pulmonale oder rektale Verabreichung verabfolgt werden. Die schließlich gewählte Art und Weise der Verabreichung wird von einer Reihe von Faktoren abhängen und kann von einem Fachmann ermittelt werden.

Durch die Erfahrung werden ferner pharmazeutische Zusammensetzungen bereitgestellt, die eine therapeutisch wirksame Menge der erfundungsgemäßen Nukleinsäuren zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Adjuvans umfassen. Die Nukleinsäurezusammensetzungen sind geeignet für das Ausbringen eines Teils oder der Gesamtheit der für OPG kodierenden Region an Zellen und Gewebe als Teil eines Antisense- oder Gentherapieplans.

25 Behandlungsverfahren

Das Knochengewebe stellt eine Stütze für den Körper dar und besteht aus Mineralien (im wesentlichen Calcium und Phosphor), einer Matrix aus kollagenen und nicht-kollagenen Proteinen, und Zellen. Drei der in Knochen, Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten auffindbaren Zelltypen sind bei dem dynamischen Prozeß involviert, durch den Knochen kontinuierlich gebildet und resorbiert wird. Die Osteoblasten fördern die Bildung des Knochengewebes, wohingegen die Osteoklasten mit der Resorption im Zusammenhang stehen. Die Resorption oder die Zersetzung der Knochenmatrix und Mineralien ist verglichen mit der Knochenbildung ein schneller und effizienter Vorgang und kann zur Freisetzung von großen Mengen an Mineralien aus dem Knochen führen. Die Osteoklasten sind bei der Regulation der normalen Umformung von Skelettgewebe und bei der durch Hormone induzierten Resorption beteiligt. Beispielsweise wird die Resorption stimuliert durch die Sekretion von Parathormon als Antwort auf sinkende Konzentrationen an Calciumionen in extrazellulären Flüssigkeiten. Im Gegensatz dazu ist die Hemmung der Resorption die grundlegende Funktion von Calcitonin. Zusätzlich verändern Metaboliten von Vitamin D das Ansprechen von Knochen auf Parathormon und Calcitonin.

Nach der Skelettmaturität spiegelt die Menge an Knochen im Skelett das Gleichgewicht (oder Ungleichgewicht) zwischen Knochenbildung und Knochenresorption wieder. Ein Spitzenzwert für Knochenmasse tritt nach Skelettmaturität vor dem 4. Lebensjahrzehnt in Erscheinung. Zwischen dem 4. und 5. Lebensjahrzehnt verlagert sich das Gleichgewicht und die Knochenresorption überwiegt. Die unausweichliche Abnahme der Knochenmasse mit steigendem Alter beginnt bei Frauen früher als bei Männern und wird bei bestimmten Frauen nach der Menopause deutlich beschleunigt (grundsätzlich bei Frauen, die von kauasischen und asiatischen Vorfahren abstammen).

Bei der Osteopenie handelt es sich um einen Zustand, der im allgemeinen mit jeglicher Abnahme der Knochenmasse auf Werte unterhalb des normalen Bereichs zusammenhängt. Ein derartiger Zustand kann aus einer sinkenden Knochensyntheserate oder aus einer ansteigenden Knochenzerstörungsrate oder aus beidem hervorgehen. Die häufigste Form der Osteopenie ist in erster Linie die Osteoporose, die auch als postmenopausale und senile Osteoporose bezeichnet wird. Diese Form der Osteoporose ist eine Folge des mit dem Alter stattfindenden universellen Knochenschwunds und ist gewöhnlich ein Ergebnis einer ansteigenden Knochenresorption bei normaler Knochenbildungsrage. Etwa 25 bis 30% aller weißen Frauen in den Vereinigten Staaten entwickeln symptomatische Osteoporose. Es besteht eine direkte Beziehung zwischen der Osteoporose und der Inzidenz von Hüft-, Oberschenkel-, Oberschenkelhals- und intertrochantären Frakturen bei Frauen im Alter von 45 Jahren und mehr. Ältere Männer entwickeln eine symptomatische Osteoporose im Alter zwischen 50 und 70, aber die Erkrankung befällt in erster Linie Frauen.

Die Ursache der postmenopausalen und senilen Osteoporose ist unbekannt. Mehrere Faktoren, die zu dem Zustand beitragen können, sind identifiziert worden. Sie schließen die mit dem Altern einhergehende Veränderung der Hormonspiegel sowie einen inadäquaten Calciumverbrauch ein, der auf eine absinkende intestinale Resorption von Calcium und anderen Mineralien zurückzuführen ist. Die Behandlungsformen haben gewöhnlich eine Hormontherapie oder Nahrungsergänzungen umfaßt, um zu versuchen, den Prozeß zu verzögern. Bis heute existiert jedoch keine wirksame Behandlungsform für Knochenschwund.

Durch die vorliegende Erfahrung wird ein Verfahren zur Behandlung einer Knochenerkrankung unter Verwendung einer therapeutisch wirksamen Menge an OPG bereitgestellt. Die Knochenerkrankung kann jedwede Störung sein, die durch einen Nettoverlust an Knochenmasse gekennzeichnet ist (Osteopenie oder Osteolyse). Im allgemeinen wird eine Behandlung mit OPG in Erwägung gezogen, wenn es notwendig ist, die Knochenresorptionsrate zu supprimieren. Demgemäß kann eine Behandlung erfolgen, damit die Knochenresorptionsrate

DE 196 54 610 A1

zu verringern, wenn die Resorptionsrate einen Wert oberhalb des normalen Bereichs aufweist, oder um die Knochenresorption auf Werte unterhalb des normalen Bereichs zu reduzieren, damit die unterhalb des normalen Bereichs liegenden Werte der Knochenbildung kompensiert werden.

Die mit OPG behandelbaren Zustände schließen die folgenden ein:

Osteoporose, wie primäre Osteoporose, endokrine Osteoporose (Hyperthyreoidismus, Hyperparathyreoidismus, Cushing-Syndrom und Akromegalie), erbliche und kongenitale Formen der Osteoporose (Osteogenesis imperfecta, Homozystinurie, Menkes-Syndrom und Riley-Day-Syndrom), und Osteoporose aufgrund einer Immobilisierung der Extremitäten.

Paget-Krankheit (Osteitis deformans) bei Erwachsenen und Jugendlichen.

Osteomyelitis, oder eine infektiöse Läsion im Knochen, die zu Knochenschwund führt.

Hyperkalzämie, resultierend aus soliden Tumoren (Brust, Lunge und Niere) und hämatologischen Malignitäten (multiples Myelom, Lymphom und Leukämie), idiopathische Hyperkalzämie, und Hyperkalzämie, die mit Hyperthyreoidismus und Nierenfunktionsstörungen assoziiert ist.

Osteopenie als Folge einer Operation, induziert durch Verabreichung von Steroiden, und assoziiert mit Störungen des Dünnd- und Dickdarms und mit chronischen Leber- und Nierenerkrankungen.

Knochennekrose, oder Absterben der Knochenzellen, das mit einer traumatischen Verletzung assoziiert ist, oder eine nichtraumatische Nekrose, die mit der Gaucher-Krankheit, Sichelzellenanämie, systemischem Lupus erythematoses und anderen Störungszuständen zusammenhängt.

Knochenschwund aufgrund von rheumatoider Arthritis. Paradontaler Knochenschwund.

Osteolytische Metastase.

Es wird davon ausgegangen, daß OPG allein oder in Verbindung mit anderen Faktoren für die Behandlung von Knochenkrankungen eingesetzt werden kann. In einer Ausführungsform wird Osteoprotegerin in Verbindung mit einer therapeutisch wirksamen Menge eines Faktors eingesetzt, welcher die Knochenbildung stimuliert. Derartige Faktoren schließen die osteomorphogenen Faktoren mit der Bezeichnung BMP-1 bis BMP-12, den transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) und Vertreter der TGF- β -Familie, Interleukin-1-Inhibitoren, TNF α -Inhibitoren, Parathormon und Analoga desselben, Nebenschilddrüse-verwandtes Protein und Analoga desselben, Prostaglandine der E-Reihe, Bisphosphonate (wie Alendronat und andere), und knochenstärkende Mineralien wie Fluorid und Calcium ein, sind aber nicht hierauf beschränkt.

Die folgenden Beispiele dienen der eingehenderen Veranschaulichung der Erfindung, wobei sie den Schutzbereich derselben jedoch nicht beschränken sollen.

Beispiel 1

Identifizierung und Isolierung der Ratten-OPG-cDNA

Die Materialien und Verfahren zur Klonierung und Analyse einer cDNA sind beschrieben von Maniatis et al, ibid. Die Polymerasenkettreaktionen (PCR) erfolgten unter Verwendung eines Thermocyclers des Typs 9600 von Perkin-Elmer und unter Einsatz einer PCR-Reaktionsmischung (Boehringer-Mannheim) und von Primerkonzentrationen entsprechend den Herstellerangaben. Im allgemeinen wurden 25–50 µl umfassende Reaktionsansätze bei 94°C denaturiert und anschließend über 20–40 Zyklen jeweils 5 Sekunden lang bei 94°C, 5 Sekunden lang bei 50–60°C und 3–5 Minuten lang bei 72°C inkubiert. Die Reaktionen wurden anschließend 3–5 Minuten lang bei 72°C behandelt. Die Reaktionsansätze wurden nachfolgend mittels Gelelektrophorese analysiert gemäß Darlegung von Maniatis et al, ibid.

Eine cDNA-Bibliothek wurde hergestellt unter Verwendung von mRNA, die aus embryonalem d20 Darm zur EST-Analyse isoliert worden war (Adams et al, Science 252, 1651–1656 (1991)). Die Rattenembryos wurden seziert, und der gesamte, sich entwickelnde Dünnd- und Dickdarm wurde entfernt und mit PBS gewaschen. Die Gesamt-Zell-RNA der Zellen wurde gereinigt durch Säureguanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (Chomczynski und Sacchi, Anal. Biochem. 162, 156–159 (1987)). Die Poly(A)⁺-mRNA-Fraktion wurde aus der Gesamt-RNA-Präparation erhalten durch Adsorption an und Elution von Dynabeads Oligo (dT)25 (Dynal Corp.), wobei die vom Hersteller empfohlenen Vorgehensweisen angewendet wurden. Unter Verwendung des Superscript Plasmid-Systems (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) wurde durch random priming eine cDNA-Bibliothek hergestellt. Der für die cDNA eingesetzte Random-Primer, der eine interne NotI-Restriktionsstelle enthält, wurde zum Starten der Erststrang-Synthese eingesetzt und wies die folgende Sequenz auf:

5' -AAAGGAAGGAAAAAGCGGCCGCTACANNNNNNNNT-3' (SEQ ID NO: 1)

NotI

Für die Erststrang-Synthese wurden drei getrennte Reaktionsansätze zusammengestellt, die 2,5 µg Poly(A)-RNA und 120 ng, 360 ng oder 1080 ng Random-Primer enthielten. Nach der Zweitstrang-Synthese wurden die Reaktionsprodukte getrennt extrahiert mit einer Mischung aus Phenol:Chloroform: Isoamylalkohol (Verhältnis 25 : 24 : 1) und anschließend mit Ethanol gefällt. Die doppelsträngigen (ds) cDNA-Produkte aus den drei Reaktionen wurden vereinigt und mit dem folgenden doppelsträngigen Oligonukleotid-Adapter ligiert:

DE 196 54 610 A1

5' -TCGACCCACCGCGTCCG-3' (SEQ ID NO: 2)
3' -GGGTGCGCAGGCP-5' (SEQ ID NO: 3)

5

Nach der Ligation wurde die cDNA vollständig mit NotI verdaut, dann mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) extrahiert und schließlich mit Ethanol gefällt. Die resuspendierte cDNA wurde anschließend der Größe nach fraktioniert durch Gelfiltration unter Verwendung vorgefertigter Säulen, die mit dem Superscript Plasmid-System (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) bereitgestellt wurden, entsprechend den Empfehlungen des Herstellers. Die beiden die größten cDNA-Produkte enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, mit Ethanol gefällt und anschließend direktonal ligiert mit NotI- und Sall-verdauter DNA des Vektors pMOB (Strathmann et al, 1991). Die ligierte cDNA wurde durch Elektroporation in kompetente ElectroMAX DH10B E. coli (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) eingeführt. Zur automatischen Sequenzanalyse wurden ungefähr 10 000 Transformanten auf 20 cm x 20 cm Agarplatten ausplattiert, die mit Ampicillin angereichertes LB-Nährmedium enthielten. Die gebildeten Kolonien wurden entnommen und in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen überführt, die 200 ml L-Brühe, 7,5% Glycerin und 50 µg/ml Ampicillin enthielten. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C kultiviert, und es wurde unter Verwendung eines sterilen, 96 Nadeln aufweisenden Replikainstruments ein doppelter Satz von Mikrotiterplatten hergestellt, bevor beide Sätze zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt wurden. Zur 10 Klonierung der cDNA in vollständiger Länge wurden ungefähr 1 000 000 Transformanten auf 96 bakterielle Ampicillinplatten ausplattiert, die jeweils etwa 10 000 Klone enthielten. Die Plasmid-DNA aus jedem Pool wurde unter Verwendung des Qiagen Plasmid Maxi Kits (Qiagen Corp., Bundesrepublik Deutschland) getrennt isoliert und für PCR-Analysen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen überführt.

Um zufällige Klone der cDNA aus dem Darm der fetalen Ratte zu sequenzieren, wurden Glycerin-Vorratsansätze aufgetaut und kleine Aliquots im Verhältnis 1 : 25 mit destilliertem Wasser verdünnt. Ungefähr 3,0 µl der verdünnten Bakterienkulturen wurden der PCR-Reaktionsmischung (Boehringer-Mannheim) zugegeben, die die folgenden Oligonukleotide enthielt:

30 5' -TGTAAAACGACGCCAGT-3' (SEQ ID NO: 4)
5' -CAGGAAACAGCTATGACC-3' (SEQ ID NO: 5)

35 Die Reaktionsansätze wurden in einem Thermocycler (Perkin-Elmer 9600) unter den folgenden Zyklusbedingungen inkubiert: 2 Minuten lang bei 94°C; 30 Zyklen 5 Sekunden lang bei 94°C, 5 Sekunden lang bei 50°C, und 3 Minuten lang bei 72°C; 4 Minuten lang bei 72°C. Nach der Inkubation in dem Thermocycler wurden die Reaktionsansätze mit 2,0 ml Wasser verdünnt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden weiter gereinigt unter Verwendung von Centricon-Säulen (Princeton Separations) unter Anwendung der vom Hersteller empfohlenen Vorgehensweisen. Die PCR-Reaktionsprodukte wurden mit einem automatisierten DNA-Sequenziergerät des Typs 373A von Applied Biosystems unter Verwendung von T3-Primer (Oligonukleotid 353-23; 5'-CAATTAAACCT-CACTAAAGG-3') (SEQ ID NO: 6f)-Taq dye-terminator reactions (Applied Biosystems) nach den vom Hersteller empfohlenen Vorgehensweisen sequenziert.

40 Die resultierende 5'-Nukleotidsequenz, die von zufällig gepickten cDNA-Klonen erhalten wurde, wurde 45 translatiert und anschließend unter Anwendung einer modifizierten Version des FASTA-Programms (Pearson et al, Meth. Enzymol. 183, (1990)) mit Datenbanken vorhandenen bekannten Proteinsequenzen verglichen. Die 50 translatierten Sequenzen wurden ferner analysiert auf Anwesenheit eines spezifischen Cystein-reichen Proteinmotivs, das in allen bekannten Vertretern der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)-Superfamilie gefunden wird (Smith et al, Cell 76, 959–962 (1994)), wobei das Sequenzprofilverfahren von Gribskov et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4355–4359 (1987)) gemäß Modifikation von Luethy et al (Protein Science 3, 139–146 (1994)) angewendet wurde.

Unter Verwendung der FASTA- und Profil-Suchdaten wurde als ein möglicher neuer Vertreter der TNFR-Superfamilie ein EST mit der Bezeichnung FRI-1 (Fetal Rat Intestine-1) identifiziert. FRI-1 enthielt ein ungefähr 600 bp großes Insert mit einem LORF von etwa 150 Aminosäuren. Die nächst kommende Sequenz in der Datenbank war der TNFR des humanen Typs II (TNFR-2). Die verglichene Region wies im Bereich dieses 150 Aminosäuren umfassenden LORFs eine ~ 43%ige Homologie zwischen TNFR-2 und FRI-1 auf. Die unter Verwendung der ersten und zweiten Cystein-reichen Wiederholungen der TNFR-Superfamilie durchgeführte Profilanalyse ergab einen Z-Wert von 8, was darauf hinweist, daß das Gen FRI-1 möglicherweise für ein neues Familienmitglied kodiert. Für die Ableitung der Struktur des FRI-1-Produkts wurde die intestinale cDNA-Bibliothek der fetal n Ratte nach Klonen vollständiger Länge abgesucht. Die folgenden Oligonukleotide wurden aus der 65 ursprünglichen FRI-1-Sequenz abgeleitet:

5' -GCATTATGACCCAGAAACCGGAC-3' (SEQ ID NO: 7)
5' -AGGTAGCGCCCTTCCTCACATTC-3' (SEQ ID NO: 8)

DE 196 54 610 A1

Diese Primer wurden in PCR-Reaktionen eingesetzt, um 96 Pools von Plasmid-DNA einem Screening zu unterziehen, wobei jeder Pool plasmidäre DNA von 10 000 unabhängigen cDNA-Klonen enthielt. Ungefähr 1 µg der Plasmidpool-DNA wurde in einer PCR-Reaktionsmischung (Boehringer-Mannheim) amplifiziert unter Einsatz eines thermischen Cyclers mit 96 Vertiefungen von Perkin-Elmer, wobei die folgenden Zyklusbedingungen angewendet wurden: 2 Minuten lang bei 94°C, 1 Zyklus; 15 Sekunden lang bei 94°C, dann 45 Sekunden lang bei 65°C, 30 Zyklen; 7 Minuten lang bei 65°C, 1 Zyklus. Die PCR-Reaktionsprodukte wurden mittels Gelektrophorese analysiert. 13 von 96 Plasmid-DNA-Pools ergaben amplifizierte DNA-Produkte mit der erwarteten relativen Molekülmasse.

Die DNA aus einem positiven Pool wurde eingesetzt, um kompetente ElectroMAX DH10B E. coli (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) wie oben beschrieben zu transformieren. Ungefähr 40 000 Transformanten wurden auf sterile Nitrocellulosefilter (BA-85, Schleicher und Schuell) ausplattiert und anschließend abgesucht durch Koloniehybridisierung unter Verwendung einer mit ^{32}P -dCTP markierten Version des oben erhaltenen PCR-Produkts. Die Filter wurden in 5 × SSC, 50% entionisiertes Formamid, 5 × Denhardt's-Lösung, 0,5% SDS, und 100 µg/ml denaturierte Lachssperm-DNA 2–4 Stunden lang bei 42°C prähybridisiert. Die Filter wurden anschließend in 5 × SSC, 50% entionisiertes Formamid, 2X Denhardt's-Lösung, 0,1% SDS, 100 µg/ml denaturierte Lachssperm-DNA, und ~5 ng/ml markierte Sonde für eine Zeitdauer von 18 Stunden bei 42°C hybridisiert. Die Filter wurden anschließend jeweils 10 Minuten lang in 2X SSC bei RT, in 1X SSC bei 55°C und schließlich 10–15 Minuten lang bei 55°C in 0,5X SSC gewaschen. Hybridisierende Klone wurden im Anschluß an eine Autoradiographie nachgewiesen und nachfolgend für ein sekundäres Screening auf Nitrocellulosefilter replatziert. Beim sekundären Screening wurde ein Plasmidklon (pB1.1) isoliert, anschließend in LB-Medium enthaltend 100 µg/ml Ampicillin amplifiziert, und die plasmidäre DNA wurde erhalten. Beide Stränge des 2,4 kb großen pB1.1-Inserts wurden sequenziert.

Die Sequenz des pB1.1-Inserts wurde im Rahmen einer FASTA-Suche in der öffentlichen Datenbank eingesetzt, um irgendwelche bestehenden Sequenzpaarungen und/oder Ähnlichkeiten aufzufinden. Es wurden keine Paarungen mit irgendwelchen bekannten Genen oder EST's gefunden, obgleich es eine ungefähr 45%ige Ähnlichkeit mit den humanen und murinen TNFR-2-Genen gab. Am Basenpaar 124 der Nukleotidsequenz wird ein Methionin-Startkodon gefunden, welchem ein LORF folgt, der für 401 Aminosäurereste kodiert und am Basenpaar 1327 endet. Das 401 Aminosäurereste aufweisende Produkt besitzt vorhersagegemäß ein hydrophobes Signalpeptid von ungefähr 31 Resten an seinem N-Terminus sowie 4 potentielle Stellen einer N-verknüpften Glykosylierung. Unter Anwendung des PepPlot-Programms (Wisconsin GCG Package, Version 8.1) wurde keine hydrophobe, den Transmembranbereich abdeckende Sequenz identifiziert. Die abgeleitete 401 Aminosäuren umfassende Sequenz wurde anschließend eingesetzt, um die Protein-Datenbank abzusuchen. Wiederum wurden keine existierenden Paarungen gefunden, obgleich es eine starke Ähnlichkeit mit vielen Vertretern der TNFR-Superfamilie zu geben schien, wobei insbesondere auf das TNFR-2 von Mensch und Maus hinzuweisen ist. Ein Sequenz-Alignment dieses neuen Proteins gegenüber bekannten Vertretern der TNFR-Superfamilie erfolgte unter Anwendung des Pileup-Programms, und das Ergebnis wurde mittels PrettyPlot (Wisconsin GCG Package, Version 8.1) modifiziert. Dieses Alignment zeigt eine klare Homologie zwischen dem FRI-1-Genprodukt vollständiger Länge und sämtlichen anderen Mitgliedern der TNFR-Familie. Die homologe Region liegt in der extrazellulären Domäne von Mitgliedern der TNFR-Familie und korrespondiert mit den in der Liganden-Bindungsdomäne dieser Proteine gefundenen vier Cystein-reichen Wiederholungen. Hierdurch wird nahegelegt, daß das Gen FRI-1 für einen neuen Vertreter der TNFR-Familie kodiert. Da keine den Transmembranbereich abdeckende Region nachgewiesen wurde zogen wir die Schlußfolgerung, daß es sich hier um einen sezernierten Rezeptor handeln dürfte, der den von TNFR-1 abgeleiteten löslichen Rezeptoren ähnlich ist (Kohno et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8331–8335 (1990)). Aufgrund der offenbar vorliegenden biologischen Aktivität des Gens FRI-1 (siehe unten) wurde das Produkt mit Osteoprotegerin (OPG) bezeichnet.

Beispiel 2

Expressionsmuster der OPG-mRNA in Geweben

Multiple humane Gewebe-Northern Blots (Clonetech) wurden mit einem mit ^{32}P -dCTP markierten FRI-1-PCR-Produkt sondiert, um die Größe des humanen Transkripts zu ermitteln und die Expressionsmuster zu bestimmen. Die Northern Blots wurden prähybridisiert in 5X SSPE, 50% Formamid, 5 × Denhardt's-Lösung, 0,5% SDS und 100 µg/ml denaturierte Lachssperm-DNA für eine Zeitdauer von 2 bis 4 Stunden bei 42°C. Die Blots wurden anschließend 18–24 Stunden lang bei 42°C in 5X SSPE, 50% Formamid, 2X Denhardt's-Lösung, 0,1% SDS, 100 µg/ml denaturierte Lachssperm-DNA mit 5 ng/ml markierter Sonde hybridisiert. Die Blots wurden anschließend jeweils 10 Minuten lang in 2X SSC bei RT, in 1X SSC bei 50°C und anschließend 10–15 Minuten lang in 0,5X SSC gewaschen.

Unter Verwendung einer von dem Rattengen abgeleiteten Sonde wurde in mehreren Geweben einschließlich Niere, Leber, Plazenta und Herz eine vorherrschende RNA-Spezies mit einer relativen Molekülmasse von etwa 2,4 kb nachgewiesen. Die höchsten Werte wurden in der Niere nachgewiesen. Im Skelettmuskel und in der Bauchspeicheldrüse wurden große mRNA-Spezies mit einer relativen Molekülmasse von 4,5 und 7,5 kb nachgewiesen. Man fand heraus, daß unter den humanen fetalnen Geweben in der Niere relativ hohe Mengen der 2,4 kb großen mRNA exprimiert werden. Unter Verwendung einer humanen Sonde (siehe unten) wird in den selben Geweben lediglich das Transkript mit einer Größe von 2,4 kb nachgewiesen. Zusätzlich wurden im Lymphknoten, im Thymus, in der Milz und im Blinddarm relativ hohe Mengen des 2,4 kb großen Transkripts nachgewiesen. Die Größe des sowohl von dem Osteoprotegeringen des Menschen als auch der Ratt nachgewiesenen Transkripts ist beinahe identisch mit der Länge des Ratteninserts pB1.1 FRI-1, was darauf hinweist, daß es sich um

einen cDNA-Klon vollständiger Länge handelte.

Beispiel 3

5 Systemische Abgabe von OPG in transgenen Mäusen

Der OPG-Klon pB1.1 der Ratte wurde als Template verwendet, um die kodierende Region für die Subklonierung in einen ApoE-leber-spezifischen Expressionsvektor mittels PCR zu amplifizieren (Simonet et al, J. Clin. Invest. 94, 1310 – 1319 (1994), und PCT-Anmeldung Nr. US 94/11675 sowie die von den selben Anmeldern eingereichte USSN 08/221 767. Für die PCR-Amplifikation wurden die folgenden 5'- bzw. 3'-Oligonukleotidprimer eingesetzt:

15 5' -GACTAGTCCCACAATGAACAAAGTGGCTGTG- 3'

(SEQ ID NO: 9)

20 5' -ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTATGAAACAGCCCAGTGACCATTG- 3'

(SEQ ID NO: 10)

Die PCR-Reaktionsmischung (Boehringer-Mannheim) wurde wie folgt behandelt: 1 Minute lang bei 94°C, 1 Zyklus; 20 Sekunden lang bei 94°C, 30 Sekunden lang bei 62°C, und 1 Minute lang bei 74°C, 25 Zyklen. Im Anschluß an die Amplifikation wurden die Proben über PCR-Säulen von Qiagen gereinigt und über Nacht mit den Restriktionsenzymen SpeI und NotI verdaut. Die Spaltprodukte wurden extrahiert und gefällt und in den ApoE-Promotor-Expressionsvektor subkloniert. Vor der Mikroinjektion des resultierenden Klons HE-OPG wurde er sequenziert, um sicherzustellen, daß er keine Mutationen aufwies.

30 Das Plasmid HE-OPG wurde durch zwei CsCl-Dichtegradientenzentrifugationen gereinigt: Die gereinigte plasmidäre DNA wurde mit XbaI und AspI verdaut, und das 3,6 kb große transgene Insert wurde mittels Gelelektrophorese gereinigt. Das gereinigte Fragment wurde verdünnt mit einer Stamminkjektionslösung von 1 µg/ml in 5 mM Tris, pH-Wert F7,4, 0,2 mM EDTA. Einzellige Embryos aus Mäusen der Kreuzung BDF1 × BDF1 erhielten Injektionen im wesentlichen wie beschrieben (Brinster et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA 82, 4338 (1985)) mit der Abweichung, daß die Injektionsnadeln vor der Verwendung abgeschrägt und silikonisiert wurden. Die Embryos wurden über Nacht in einem CO₂-Inkubator kultiviert, und 15 bis 20 2-zellige Embryos wurden in die Eileiter von scheinschwangeren weiblichen CD1-Mäusen transferiert.

35 Nach Ablauf der Schwangerschaft wurden aus der Implantation von mikroinjizierten Embryos 49 Nachkommen erhalten. Die Nachkommenschaft wurde durch PCR-Amplifikation des integrierten Transgens in genetischen DNA-Proben einem Screening unterzogen. Die Zielregion für die Amplifikation war eine 369 bp umfassende Region des humanen ApoE-Introns, das im Expressionsvektor enthalten war. Die für die PCR-Amplifikation verwendeten Oligos waren:

45 5' -GCC TCT AGA AAG AGC TGG GAC- 3' (SEQ ID NO: 11)

5' -CGC CGT GTT CCA TTT ATG AGC- 3' (SEQ ID NO: 12)

50 Die PCR-Bedingungen waren: 2 Minuten lang bei 94°C, 1 Zyklus; 1 Minute lang bei 94°C, 20 Sekunden lang bei 63°C, und 30 Sekunden lang bei 72°C, 30 Zyklen. Von den ursprünglich 49 Nachkommen erwiesen sich 9 als PCR-positive transgene Tiere.

55 Im Alter von 8–10 Wochen wurden 5 transgene Tiere (2, 11, 16, 17 und 28) und 5 Kontrolltiere (1, 12, 15, 18 und 30) für eine Nekropsie und pathologische Analyse eingeschläfert. Die Leber wurde aus den verbleibenden 4 transgenen Tieren durch partielle Hepatektomie isoliert. Für die partielle Hepatektomie wurden die Mäuse betäubt, und ein Leberlappen wurde chirurgisch entfernt. Aus den Lebern sämtlicher transgener Tiere sowie der 5 negativen Kontrolltiere desselben Wurfes wurde zelluläre Gesamt-RNA wie beschrieben isoliert (McDonald et al, Meth. Enzymol. 152, 219 (1987)). Mit diesen Proben wurde eine Northern Blot-Analyse durchgeführt, um das Ausmaß der transgenen Expression zu ermitteln. Ungefähr, 10 µg Gesamt-RNA aus jeder Tierleber wurden mittels denaturierender Elektrophorese aufgetrennt (Ogden et al, Meth. Enzymol. 152, 61 (1987)), anschließend auf HYBOND-N-Nylonmembran (Amersham) überführt und mit ³²P-dCTP-markierter DNA des pB1.1-Inserts sondiert. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 42°C in 50% Formamid, 5X SSPE, 0,5% SDS, 5X Denhardt's-Lösung, 100 µg/ml denaturiert Lachssperm-DNA mit 2–4 × 10⁶ cpm markierter Sonde/ml Hybridisierungspuffer durchgeführt. Im Anschluß an die Hybridisierung wurden die Bl. ts 2-mal für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur in 2X SSC, 0,1% SDS, und anschließend 2 × jeweils 5–10 Minuten lang bei 55°C in 0,1 × SSC, 0,1% SDS gewaschen. Im Anschluß an die Autoradiographie wurde die Expression des Transgens in behandelten und Kontrolltieren desselben Wurfes bestimmt.

60 Die Daten der Northern Blots zeigen, daß 7 der transgenen Tiere nachweisbare Mengen der transgenen

mRNA exprimieren (Tiere #2, 11, 16, 17, 22, 33 und 45). Die negativen Kontrollmäuse und eines der transgenen Tiere (#28) exprimierten keine mit dem Transgen in Zusammenhang stehende mRNA. Da OPG vorhersagegemäß ein sezerniertes Protein ist, sollte eine Überexpression von transgener mRNA stellvertretend sein für die Menge an systemisch abgegebenem Genprodukt. Von den Mäusen, die sich in der PCR und im Northern Blot positiv zeigten, exprimierten die Tiere 2, 17 und 22 die größten Mengen an transgener mRNA und können auf Wirtszellen und Gewebe umfassendere biologische Effekte ausüben.

5

Beispiel 4

Biologische Aktivität von OPG

10

Fünf der transgenen Mäuse (Tiere 2, 11, 16, 17 und 28) und 5 Kontrolltiere desselben Wurfes (Tiere 1, 12, 15, 18 und 30) wurden unter Anwendung der folgenden Vorgehensweisen für eine Nekropsie und pathologische Analyse eingeschläfert: vor der Euthanasie wurden die Identifizierungsnummern sämtlicher Tiere überprüft, und anschließend wurden sie gewogen und einer Anästhesie und Blutabnahme zugeführt. Das Blut wurde sowohl als Serum als auch als Vollblut aufgehoben für eine vollständige chemische Serum- und Hämatologie-Panel-Untersuchung. Die Röntgenaufnahme erfolgte unmittelbar nach der abschließenden Anästhesie durch letale CO₂-Inhalation und vor der Dissektion. Hieran anschließend wurden die Gewebe entfernt und für eine histologische Untersuchung in 10% gepuffertem Zn-Formalin fixiert. Die gesammelten Gewebe umfaßten Leber, Milz, Bauchspeicheldrüse, Magen, Zwölffingerdarm, Ileum, Colon, Niere, Fortpflanzungsorgane, Haut- und Brustdrüsen, Knochen, Gehirn, Herz, Lunge, Thymus, Luftröhre, Ösophagus, Schilddrüse, Jejunum, Zökum, Rektum, Nebennieren, Harnblase und Skelettmuskel. Vor der Fixierung wurden die Gewichte der vollständigen Organe Leber, Magen, Niere, Nebennieren, Milz und Thymus ermittelt. Nach der Fixierung wurden die Gewebe zu Paraffinblöcken verarbeitet, und es wurden Schnitte mit einer Dicke von 3 µm erhalten. Das Knochengewebe wurde unter Verwendung einer Ameisensäurelösung entkalkt, und sämtliche Schnitte wurden mit Hämatoylin und Eosin gefärbt. Zusätzlich wurden bestimmte Gewebe durch Gomori-Silberimprägnation und Masson-Färbung gefärbt. Die enzymhistochemische Untersuchung erfolgte, um die Expression der Tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) zu ermitteln, wobei es sich hier um ein Enzym handelt, welches von Osteoklasten, vielkernigen Knochen-resorbierenden Zellen der Monozyten-Makrophagen-Abstammung, in hohem Maße exprimiert wird. Die immunhistochemische Untersuchungen in bezug auf BrdU und das Monozyten-Makrophagen-Oberflächenantigen F480 wurden ebenfalls durchgeführt, um replizierende Zellen bzw. Zellen der Monozyten-Makrophagen-Abstammung nachzuweisen. Um die Expression des Oberflächenantigens F480 nachzuweisen, wurden mit Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete Schnitte mit einer Dicke von 4 µm entparaffiniert und mit entionisiertem Wasser hydratisiert. Die Schnitte wurden mit 3% Wasserstoffperoxid abgeschreckt, mit Protein-Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA) blockiert und anschließend mit monoklonalem Anti-Maus F480 der Ratte inkubiert (Harlan, Indianapolis, IN). Dieser Antikörper wurde durch biotinylierte Anti-Ratten-Immunglobulin-Antikörper des Kaninchens und Peroxidase-konjugiertem Streptavidin (BioGenex San Ramon, CA) mit DAB als Chromagen nachgewiesen (BioTek, Santa Barbara, CA). Die Schnitte wurden mit Hämatoylin gegenfärbt.

15

Bei der Dissektion und Beobachtung der viszeralen Gewebe wurden in den transgenen Expressoren und in den Kontrolltieren desselben Wurfes keine Abnormalitäten gefunden. Eine Analyse der Organgewichte zeigt, daß die Größe der Milz in den transgenen Mäusen gegenüber den Kontrollen um etwa 38% zunahm. Bei den transgenen Expressoren wurde eine leichte Vergrößerung der Thrombozyten sowie eine erhöhte Anzahl an zirkulierenden ungefärbten Zellen gefunden. Bei den transgenen Expressoren wurde ein marginales Absinken des Thrombozytenspiegels beobachtet. Zusätzlich tendierten die Werte für Harnsäure, Harnstickstoff und alkalische Phosphatase im Serum der transgenen Expressoren nach unten. Man stellte fest, daß die Expressoren eine erhöhte Kontrastdichte des Skeletts aufwiesen, einschließlich Röhrenknochen (Oberschenkel), Wirbel und platten Knochen (Becken). Die relative Größe der Oberschenkel bei den Expressoren unterschied sich nicht von derjenigen bei Kontrollmäusen.

20

Eine histologische Analyse von gefärbten Knochenschnitten aus den OPG-Expressoren zeigt eine schwere Osteopetrosie mit vorhandenen Knorpelüberresten aus der primären Spongiosa, die in den Knochentrabekel in der Diaphyse des Oberschenkels beobachtet wurde. In den Oberschenkelschnitten war ein klar definierter Kortex nicht identifizierbar. Bei normalen Tieren ist die zentrale Diaphyse mit Knochenmark gefüllt. Wirbelschnitte zeigen ebenfalls osteoprotische Veränderungen, was bedeutet, daß die durch OPG induzierten Skelettsveränderungen systemisch waren. Das restliche Knochenmark wies vorherrschend myeloische Elemente auf. Megakaryozyten waren vorhanden. Die Retikulinfärbungen lieferten keine Anzeichen einer Retikulinablagerung. Die immunhistochemische Untersuchung nach F480, einem Zelloberflächenantigen, welches von Zellen der Monozyten-Makrophagen-Abstammung in der Maus exprimiert wird, zeigte das Vorhandensein von F480-positiven Zellen in den Markhöhlen. Direkt neben den trabekulären Knochenoberflächen konnten fokale, abgeflachte, F480-positive Zellen nachgewiesen werden.

25

Die die Knochentrabekel beschichteten mesenchymalen Zellen waren abgeflacht und schienen inaktiv zu sein. Auf der Grundlage der H&E- und TRAP-Färbungen wurden Osteoklasten auf den Oberflächen trabekulärer Knochen in den OPG-Expressoren nur in geringer Anzahl gefunden. Im Gegensatz dazu wurden in der Knorpel resorbierenden Wachstumszone Osteoklasten und/oder Chondroblasten beobachtet, wobei ihre Anzahl im Vergleich zu Kontrollen aber reduziert sein kann. Ferner waren auf der kortikalen Oberfläche der Metaphyse, wo die Umformungsaktivität gewöhnlich stark ausgeprägt ist, ebenfalls Osteoklasten vorhanden. Der vorherrschende Unterschied zwischen den Expressoren und den Kontrolltieren ist die ausgeprägte Abnahme der trabekulären Osteoklasten, sowohl in den Wirbeln als auch in den Oberschenkeln. Das Ausmaß der Knochenak-

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 196 54 610 A1

kumulation war direkt korreliert mit der Menge an OPG-transgener mRNA, die durch Northern Blotting von Gesamt-RNA der Leber nachgewiesen wurde.

Die Milzorgane der OPG-Expressoren wiesen eine erhöhte Menge an roter Milzpulpa auf, wobei die Expansion auf einer gesteigerten Hämatopoiese beruht. Sämtliche hämatopoetischen Abstammung kann werden repräsentiert. F480-positive Zellen waren in der roten Milzpulpa von sowohl Kontrolltieren als auch von OPG-Expressoren vorhanden. Zwei der Expressoren (2 und 17) wiesen in der Leber Foci extramedulärer Hämatopoiese auf, was wahrscheinlich auf das osteopetrosche Knochenmark zurückzuführen ist.

Es gab keine feststellbaren Abnormalitäten in dem Thymus, den Lymphknoten, dem Magen-Darm-Trakt, dem Pankreato-hepatobiliären Trakt, dem Respirationstrakt, dem Fortpflanzungssystem, dem urogenitalen System, der Haut, dem Nervensystem, dem Herzen und der Aorta, der Brust, des Skelettmuskel und im Fett.

Beispiel 5

Isolierung von muriner und humarer OPG-cDNA

Ein mit dem 5'-Ende der murinen OPG-mRNA korrespondierender cDNA-Klon wurde mittels PCR-Amplifikation aus einer Mausnieren-cDNA-Bibliothek (Clontech) isoliert. Die Oligonukleotide wurden von der OPG-cDNA-Sequenz der Ratte abgeleitet und werden nachfolgend wiedergegeben:

5' -ATCAAAGGCAGGGCATACTTCCTG-3' (SEQ ID NO: 13)
5' -GTTGCACTCCTGTTCACGGTCTG-3' (SEQ ID NO: 14)

5' -CAAGACACCTTGAAAGGGCCTGATG-3' (SEQ ID NO: 15)
5' -TAACTTTACAGAAGAGCATCAGC-3' (SEQ ID NO: 16)

5' -AGCGCGGCCGCATGAACAAGTGGCTGTGCTGCG-3' (SEQ ID NO: 17)
5' -AGCTCTAGAGAACAGCCCAGTGACCATTCC-3' (SEQ ID NO: 18)

Die anhand dieses Verfahrens erhaltenen partiellen und die vollständige Länge aufweisenden cDNA-Produkte wurden sequenziert. Das Produkt vollständiger Länge wurde mit NotI und XbaI verdaut und anschließend direktional in den Plasmidvektor pRcCMV (Invitrogen) kloniert. Das resultierende Plasmid erhielt die Bezeichnung pRcCMV-Mu-OPG. Die Nukleotidsequenz des klonierten Produkts wurde mit der cDNA-Sequenz vom OPG der Ratte verglichen. Im Bereich der den OPG-LORF abdeckenden, 1300 bp umfassenden Region waren die DNA-Sequenzen der Ratte und der Maus ungefähr 88% identisch. Die cDNA-Sequenz der Maus enthielt einen 401 Aminosäuren umfassenden LORF, welcher im Vergleich zu der OPG-Proteinsequenz der Ratte eine Identität ohne Lücken von ~94% aufwies. Dies zeigt, daß die isolierte cDNA-Sequenz der Maus für das murine OPG-Protein kodiert, und daß die Sequenz und Struktur während der Evolution im hohen Maße konserviert worden sind. Die OPG-Proteinsequenz der Maus enthält an seinem N-Terminus ein identisches putatives Signalpeptid, und sämtliche vier potentiellen Stellen einer N-verknüpften Glykosylierung sind konserviert.

Eine partielle humane OPG-cDNA wurde aus einer humanen Nieren-cDNA-Bibliothek unter Verwendung der folgenden Ratten-spezifischen Oligonukleotide kloniert:

5' -GTG AAG CTG TGC AAG AAC CTG ATG-3' (SEQ ID NO: 19)
5' -ATC AAA GGC AGG GCA TAC TTC CTG-3' (SEQ ID NO: 20)

Dieses PCR-Produkt wurde sequenziert und für die Schaffung von Primern zur Amplifikation des 3'-Endes der humanen cDNA eingesetzt, wobei als Template ein humarer genomischer OPG-Klon in Lambda verwendet wurde:

5' -TCCGTAAGAACAGCCCAGTGACC-3' (SEQ ID NO: 29)
5' -CAGATCCTGAAGCTGCTCAGTTG-3' (SEQ ID NO: 21)

Das amplifizierte PCR-Produkt wurde sequenziert und zusammen mit der Sequenz des 5'-Endes zur Schaffung von human-spezifischen 5'- und 3'-Primermolekülen verwendet, die für die Amplifikation der vollständigen, für humanes OPG kodierenden cDNA-Sequenzen geeignet sind:

5'-AGCGCGGCCGCGGGGACCACAATGAACAAAGTTG-3' (SEQ ID NO: 22)

5'-AGCTCTAGAATTGTGAGGAAACAGCTCAATGGC-3' (SEQ ID NO: 23)

5

Das humane PCR-Produkt vollständiger Länge wurde sequenziert und anschließend unter Verwendung von NotI und XbaI direkional in den Plasmidvektor pRcCMV (Invitrogen) kloniert. Das resultierende Plasmid erhielt die Bezeichnung pRcCMV-human OPG. Die Nukleotidsequenz des klonierten Produkts wurde mit den cDNA-Sequenzen des Ratten- und Maus-OPGs verglichen. Im Bereich der den OPG-LORF abdeckenden, 1300 bp umfassenden Region waren die DNA-Sequenzen der Ratte und der Maus ungefähr 78–88% identisch mit der humanen OPG-cDNA. Die humane OPG-cDNA-Sequenz enthielt ebenfalls einen 401 Aminosäuren umfassenden LORF, welcher mit den Proteinsequenzen der Ratte und der Maus verglichen wurde. Das vorhergesagte humane OPG-Protein ist ungefähr zu 85% und zu 90% identisch mit den Proteinen der Ratte bzw. der Maus. Ein Sequenz-Alignment der Proteine der Ratte, der Maus und des Menschen zeigt, daß sie während der Evolution in hohem Maße konserviert worden sind. Das humane Protein weist nach Vorhersage ein N-terminales Signalpeptid sowie 5 potentielle Stellen einer N-verknüpften Glykosylierung auf, von denen 4 unter den OPG-Proteinen der Ratte und der Maus konserviert sind.

Die DNA- sowie die abgeleitete Aminosäuresequenz vom OPG der Maus ist in den Fig. 9A und 9B (SEQ ID NO: 122) dargestellt. Die DNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von humanem OPG ist in den Fig. 9C und 9D (SEQ ID NO: 124) dargestellt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen vom OPG der Ratte, der Maus und des Menschen ist in den Fig. 9E und 9F dargestellt.

Die Isolierung zusätzlicher humarer OPG-cDNA-Klone ergab die Existenz eines Basenaustauschs von G zu C an Position 103 der in Fig. 9C dargestellten DNA-Sequenz. Dieser Nukleotidaustausch führt an Position 3 der in Fig. 9C dargestellten Aminosäuresequenz zur Substitution eines Lysins durch ein Asparagin. Der Rest der Sequenz in Klonen mit diesem Austausch war identisch mit der in den Fig. 9C und 9D.

10

15

20

25

30

Beispiel 6

Entwicklung eines dreidimensionalen OPG-Strukturmodells

Der aminoterminale Bereich von OPG weist eine Homologie zu dem extrazellulären Bereich aller bekannten Mitglieder der TNFR-Superfamilie auf (Fig. 1C). Das bedeutendste Motiv in dieser Region von TNFR-verwandten Genen ist eine ~40 Aminosäuren umfassende, Cystein-reiche Wiederholungssequenz, die sich zu distinkten Strukturen faltet (Banner et al., Cell 73, 431–445 (1993)). Dieses Motiv tritt gewöhnlich in vier (Bereich 3–6) Tandem-Wiederholungen (siehe Fig. 1C) auf und ist bekanntermaßen an der Ligandenbindung beteiligt (Beutler und van Huffel, Science 264, 667–663 (1994)). Jede Wiederholung enthält gewöhnlich sechs voneinander entfernte Cysteinreste, die bei der Ausbildung dreier Disulfidbindungen mit der Bezeichnung SS1, SS2 und SS3 innerhalb der Domäne beteiligt sind (Banner et al., ibid.). Bei einigen Rezeptoren wie TNFR2, CD30 und CD40, enthalten einige der Wiederholungsdomänen lediglich zwei innerhalb der Kette vorhandene Disulfidbindungen (SS1 und SS3).

35

40

Die humane OPG-Proteinsequenz wurde unter Anwendung von Verfahren gemäß Luethy et al., ibid., einem Alignment mit einem Profil der extrazellulären Domäne von TNFR1 unterzogen, und die Ergebnisse wurden unter Anwendung des PrettyPlot-Programms von Wisconsin Package, Version 8.1 (Genetics Computer Group, Madison, WI) graphisch dargestellt (Fig. 10). Das Alignment zeigt eine klare Konservierung von Cysteinresten, die bei der Bildung der Domänen 1–4 involviert sind. Dieses Alignment wurde anschließend zur Schaffung eines dreidimensionalen (3-D) Modells der humanen, N-terminalen OPG-Domäne eingesetzt, wobei als Template die bekannte 3-D-Struktur der extrazellulären Domäne von p55 TNFR1 (Banner et al., ibid.) eingesetzt wurde. Hierfür wurden die Atomkoordinaten des Peptidrückgrats und der Seitenketten identischer Reste von den Kristallstrukturkoordinaten von TNFR1 kopiert. Hieran anschließend wurden die übrigen Koordinaten für die Insertionen und unterschiedlichen Seitenketten unter Anwendung des LOOK-Programms (Molecular Applications Group, Palo Alto, CA) generiert. Das 3-D-Modell wurde unter Anwendung von LOOK anschließend durch Minimierung seiner konformationellen Energie verfeinert.

55

Durch Analogie mit anderen Vertretern der TNFR-Familie wird davon ausgegangen, daß OPG an einen Liganden bindet. Für das Modelling der Interaktion zwischen OPG und seinem Liganden wurde die Kristallstruktur von TNF- β eingesetzt, um eine 3-D-Darstellung eines "OPG-Liganden" zu simulieren. Diese Daten wurden unter Anwendung von Molscript (Kraulis, J. Appl. Cryst. 24, 946–950, 1991) graphisch dargestellt (siehe Fig. 11). Ein Modell für den OPG/Liganden-Komplex mit 3 TNF- β - und 3 OPG-Molekülen wurde hergestellt, wobei die relativen Positionen von OPG in der Kristallstruktur mit TNFR1 identisch sind. Dieses Modell wurde anschließend eingesetzt, um die Reste von OPG aufzufinden, die mit seinem Liganden interagieren könnten, wobei der folgende Ansatz verfolgt wurde: Der für Lösungsmittel zugängliche Bereich sämtlicher Reste in dem Komplex und ein einzelnes OPG-Modell wurden berechnet. Die Reste, deren Zugänglichkeit sich im Komplex und im Monomer unterscheiden, interagieren wahrscheinlich mit dem Liganden.

60

Die Aminosäuresequenzen vom OPG des Menschen und der Maus wurden unter Verwendung dieser Information erneut einem Alignment zugeführt, um Sequenzen hervorzuheben, welche jede der Cystein-reichen Domänen 1–4 umfassen (Fig. 12A und 12B). Jed Domäne weist vorhersagbare individuelle Struktureigenschaften auf:

65

Domäne 1

Sie enthält 4 Cysteine, die an den SS2 (C41 bis C54)- und SS3 (C44 bis C62)-Disulfidbindungen beteiligt sind. Obgleich keine auf Disulfidbrücken basierende SS1-Bindung evident ist, ist das konservierte Tyrosin an Position 28 homolog zu Y20 in TNFR1, das bekanntermaßen bei der Interaktion mit H66 zur Unterstützung der Domänenbildung beteiligt ist. OPG weist an Position 75 ein homologes Histidin auf, was darauf hinweist, daß OPG Y28 und H75 im nativen Protein zusammengesetzt sind, wie es bei homologen Resten in TNFR1 der Fall ist. Demgemäß können tatsächlich beide dieser Reste für die biologische Aktivität wichtig sein, und N-terminale OPG-Verkürzungen bis zu und über Y28 hinaus können über eine veränderte Aktivität verfügen. Zusätzlich wird anhand unseres drei-dimensionalen Modells vorhergesagt, daß die Reste E34 und K43 mit einem gebundenen Liganden interagieren.

Domäne 2

Sie enthält 6 Cysteine und enthält vorhersagegemäß SS1 (C65 bis C80)-, SS2 (C83 bis C98)- und SS3 (C87 bis C105)-Disulfidbindungen. Diese OPG-Region enthält ebenfalls eine sich von P66 bis Q91 erstreckende Region, die sich mit dem Teil der TNFR1-Domäne 2 in einem Alignment befindet, der einen engen Kontakt mit TNF β ausbildet (siehe oben), und mit einem OPG-Liganden interagieren kann. Nach Vorhersage anhand unserer Strukturdaten interagieren insbesondere die Reste P66, H68, Y69, Y70, T71, D72, S73, H75, T76, S77, D78, E79, L81, Y82, P85, V86, K88, E89, L90 und Q91 mit einem gebundenen Liganden.

Domäne 3

Sie enthält 4 Cysteine, die an SS1 (C107 bis C118)- und SS3 (C124 bis C142)-Disulfidbindungen, nicht aber an einer SS2-Bindung beteiligt sind. Nach Vorhersage anhand unserer Strukturdaten interagieren die Reste E115, L118 und K119 mit einem OPG-Liganden.

Domäne 4

Sie enthält ähnlich der Domäne 3 4 Cysteine, die an SS1 (C145 bis C160)- und SS3 (C166 bis C185)-Disulfidbindungen, nicht aber an einer SS2-Bindung beteiligt sind. Unsere Strukturdaten ergeben, daß E153 und S155 mit einem OPG-Liganden interagieren. Demgemäß führt das vorhergesagte OPG-Strukturmodell zur Identifizierung einer Reihe von hochkonservierten Resten, die für dessen biologische Aktivität wahrscheinlich wichtig sind.

Beispiel 7

Herstellung von rekombinannten, sezernierten OPG-Proteinen in Säugerzellen

Um festzustellen, ob OPG tatsächlich ein sezerniertes Protein ist, wurde die OPG-cDNA der Maus mit der humanen IgG1 Fc-Domäne als Tag fusioniert (Capon et al., Nature 337, 525–531 (1989)) und in humanen 293-Fibroblasten exprimiert. Die Fc-Fusionen erfolgten unter Verwendung des Vektors pFc-A3. pFc-A3 enthält die für den Fc-Teil der schweren Kette des humanen Immunglobulins IgG- γ 1 kodierende Region (Ellison et al., ibid.) von der ersten Aminosäure der Gelenkdomäne (Glu-99) bis zum Carboxyterminus und ist flankiert von einer 5'-NotI-Fusionsstelle und 3'-Sall- und XbaI-Stellen. Das Plasmid wurde durch PCR-Amplifikation der humanen Milz-cDNA-Bibliothek (Clontech) hergestellt. Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem Endvolumen von 100 μ l unter Verwendung von 2 Einheiten Vent DNA-Polymerase (New England Biolabs) in 20 mM Tris-HCl (pH-Wert 8,8), 10 mM KCl, 10 μ M (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100 mit 400 μ M eines jeden dNTPs und 1 ng der zu amplifizierenden cDNA-Bibliothek zusammen mit 1 μ M eines jeden Primers. Die Reaktionen wurden initiiert durch Denaturierung bei 95°C für 2 Minuten sowie durch anschließende 30 Zyklen bei 95°C für 30 Sekunden, 55°C für 30 Sekunden und 73°C für 2 Minuten. Der 5'-Primer

5' -ATAGCGGCCGCTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACTCAC 3'

(SEQ ID NO: 24)

umfaßte eine NotI-Stelle unmittelbar 5' vom ersten Rest (Glu-99) der Gelenkdomäne von IgG- γ 1. Der 3'-Primer

5' -TCTAGAGTCGACTTATCATTACCCGGAGACAGGGAGAGGGCTCTT-3'

(SEQ ID NO: 25)

umfaßte Sall- und XbaI-Stellen. Das 717 bp umfassende PCR-Produkt wurde mit NotI und Sall verdaut, mittels Elektrophorese in 1%iger Agarose (FMC Corp.) isoliert, durch das GeneClean-Verfahren (BIO 101, Inc.) gereinigt und in den mit NotI und Sall verdauten Vektor pBluescript II KS (Stratagene) kloniert. Das Insert des resultierenden Plasmids, pFc-A3, wurde sequenziert, um die Naturtreue der PCR-Reaktion zu bestätigen.

DE 196 54 610 A1

Die im Plasmid pRcCMV-MuOPG klonierte cDNA der Maus wird unter Verwendung der folgenden beiden Sätze an Primerpaaren amplifiziert:

Paar 1

5'-CCTCTGAGCTCAAGCTTCCGAGGACCACAATGAACAAG-3'

(SEQ ID NO: 26)

5

5'-CCTCTGCCCGCTAACCGAGCTTACGGATTGAACCTG-3'

(SEQ ID NO: 27)

10

Paar 2

5'-CCTCTGAGCTCAAGCTTCCGAGGACCACAATGAACAAG-3'

(SEQ ID NO: 28)

15

5'-CCTCTGCCCGCTTGCATTCCTTCTG-3'

(SEQ ID NO: 30)

20

25

Das erste Paar führt zur Amplifikation des gesamten OPG-LORF und zur Schaffung einer NotI-Restriktionsstelle, welche mit der im Leserahmen befindlichen NotI-Stelle im Fc-Fusionsvektor pFcA3 kompatibel ist. pFcA3 wurde hergestellt durch Etablierung einer NotI-Restriktionsstelle 5' vom Asparaginsäurerest 216 der humanen IgG1 Fc-cDNA. Durch dieses Konstrukt wird ein Linker eingeführt, der für 2 irrelevante Aminosäuren kodiert, welche die Verbindung zwischen dem OPG-Protein und der IgG Fc-Region abdecken. Dieses Produkt würde im Falle der Verknüpfung mit dem Fc-Anteil für sämtliche 401 OPG-Reste und direkt anschließend sämtliche 227 Aminosäurereste der humanen IgG1 Fc-Region (F1.Fc) kodieren. Das zweite Primerpaar führt zur Amplifikation der DNA-Sequenzen, die für die ersten 180 Aminosäurereste von OPG kodieren, welche dessen putative Liganden-Bindungsdomäne umfassen. Wie oben ausgeführt, wird durch den 3'-Primer eine künstliche NotI-Restriktionsstelle geschaffen, die zur direkten Fusion des C-terminal verkürzten OPG-LORF an Position Threonin 180 mit der IgG1 Fc-Domäne (Sta.) führt.

Die Verknüpfungsstelle in der Aminosäuresequenz, an welcher der OPG-Rest 401 und der Asparaginsäurerest 221 der humanen Fc-Region verknüpft werden, kann wie folgt modifiziert werden: Die für die Reste 216–220 der humanen Fc-Region kodierende DNA kann wie nachfolgend beschrieben deletiert werden, oder der mit C220 der humanen Fc-Region korrespondierende Cysteinrest kann entweder zu Serin oder Alanin mutiert werden. Das durch diese modifizierten Vektoren kodierte OPG-Fc-Fusionsprotein kann zur Transfektion von humanen 293-Zellen oder von CHO-Zellen eingesetzt werden, und rekombinantes OPG-Fc-Fusionsprotein kann wie nachfolgend beschrieben gereinigt werden.

Beide Produkte wurden direkional in den Plasmidvektor pCEP4 (Invitrogen) kloniert. pCEP4 enthält den Replikationsursprung des Epstein-Barr-Virus und ist in der Lage zur episomalen Replikation in 293-EBNA-1-Zellen. Unter Anwendung der vom Hersteller empfohlenen Verfahren wurden der Muttervektor pCEP4 sowie die Vektoren pCEP4-F1.Fc und pCEP4-CT.Fc mittels Lipofektion in 293-EBNA-1-Zellen eingeführt. Die transfizierten Zellen wurden anschließend zur Auswahl den Vektor exprimierender Zellen einer Selektion in 100 µg/ml Hygromycin unterzogen, und die resultierenden Arzneimittel-resistenten Massenkulturen wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden anschließend 72 Stunden lang in serumfreiem Medium kultiviert, und das konditionierte Medium wurde entfernt und mittels SDS-PAGE analysiert. Durch Silberfärbung des Polyacrylamidgels wurden die von den Arzneimittel-resistenten 293-Kulturen produzierten Hauptproteine des konditionierten Mediums nachgewiesen. In den durch pCEP4-F1.Fc und pCEP4-CT.Fc konditionierten Medien wurden einmalige Banden der vorhergesagten Größen in großem Umfang sekretiert (siehe Fig. 13B und 13C). Das Fc-Fusionsprotein vollständiger Länge akkumulierte in einer hohen Konzentration, wodurch angezeigt wird, daß es stabil sein kann. Beide Fc-Fusionsproteine wurden in Western Blots mit anti-human IgG1 Fc-Antikörpern (Pierce) nachgewiesen, wodurch gezeigt wird, daß sie rekombinante OPG-Produkte sind.

Die OPG-Fc-Fusionsproteine vollständiger Länge wurden nach den Empfehlungen des Herstellers mittels Protein-A-Säulenchromatographie (Pierce) gereinigt. Das Protein wurde anschließend einer N-terminalen Sequenzanalyse durch automatisierten Edman-Abbau im wesentlichen gemäß Darlegung von Matsudaira et al. (J. Biol. Chem. 262, 10–35 (1987)) zugeführt. Nach 19 Zyklen wurde die folgende Aminosäuresequenz ermittelt:

NH₂-E T L P P K Y L H Y D P E T G H Q L L-CO₂H

65

(SEQ ID NO: 31)

5 Diese Sequenz war identisch mit der vorhergesagten, am Aminosäurerest 22 beginnenden Aminosäuresequenz vom OPG der Maus, wodurch nahegelegt wird, daß sich die natürliche Säuger-Leader-Spaltstelle nicht, wie ursprünglich vorhergesagt, zwischen den Aminosäureresten Y31—D32, sondern zwischen Q21—E22 befindet. Die in 293-EBNA-Zellen mit pCEP4-F1.Fc und pCEP4-CT.Fc durchgeföhrten Expressionsexperimente zeigen, daß OPG ein sezerniertes Protein ist und systemisch die Bindung seines Liganden bewirken kann.

Ähnliche Verfahren, wie sie zur Herstellung und Expression der muOPG[22-180]-Fc- und muOPG[2-401]-Fc-Fusionen angewendet werden, wurden für zusätzliche murine und humane OPG-Fc-Fusionsproteine eingesetzt.

10 Das Konstrukt einer Fusion der für die Aminosäuren 1—185 kodierenden murinen OPG-cDNA mit der Fc-Region von humanem IgG1 [muOPG Ct(185).Fc] wurde wie folgt geschaffen. Murine OPG-cDNA aus dem Plasmid pRcCMV Mu Osteoprotegerin (in Beispiel 5 beschrieben) wurde unter Verwendung des folgenden Primerpaars in einer Polymerasekettenreaktion wie oben beschrieben amplifiziert:

15 1333-82:

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3'

20 (SEQ ID NO: 32)

1333-80:

25 5'-CCT CTG CGG CCG CAC ACA CGT TGT CAT GTG TTG C-3'

(SEQ ID NO: 33)

30 Dieses Primerpaar führt zur Amplifikation der für die Aminosäurereste 63—185 (korrespondierend mit bp 278—645) des in Fig. 9A dargestellten OPG-Leserahmens kodierenden Region der murinen OPG-cDNA. Der 3'-Primer enthält eine NotI-Restriktionsstelle, die mit der im Leserahmen befindlichen NotI-Stelle des Fc-Fusionsvektors pFcA3 kompatibel ist. Das Produkt deckt ferner eine am bp 436 lokalisierte einmalige EcoRI-Restriktionsstelle ab. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde gereinigt, mit NotI und EcoRI gespalten, und das resultierende EcoRI-NotI-Restriktionsfragment wurde gereinigt. Der Vektor pCEP4 mit dem murinen 1—401 OPG-Fc-Fusionsinsert wurde mit EcoRI und NotI gespalten, gereinigt, und mit dem oben generierten PCR-Produkt ligiert. Der resultierende, auf pCEP4 basierende Expressionsvektor kodiert für die OPG-Reste 1—185, direkt gefolgt von sämtlichen 227 Aminosäureresten der humanen IgG1-Fc-Region. Der murine OPG 1—185.Fc-Fusionsvektor wurde mittels Transfektion in 293-Zellen eingeföhrt, bevor diese einer Arzneimittel-Selektion unterzogen wurden und das konditionierte Medium wie oben beschrieben produziert wurde. Das resultierende sekretierte murine OPG 1—185.Fc-Fusionsprodukt wurde nach den Empfehlungen des Herstellers mittels Protein-A-Säulenchromatographie (Pierce) gereinigt.

40 Das Konstrukt der Fusion der für die Aminosäurereste 1—194 kodierenden murinen OPG-DNA mit der Fc-Region von humanem IgG1 (muOPG Ct(194).Fc) wurde wie folgt geschaffen. Die OPG-cDNA der Maus von dem Plasmid pRcCMV Mu-Osteoprotegerin wurde unter Verwendung der folgenden Primerpaare amplifiziert:

1333-82:

50 5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3'

(SEQ ID NO: 34)

1333-81:

55 5'-CCT CTG CGG CCG CCT TTT GCG TGG CTT CTC TGT T-3'

(SEQ ID NO: 35)

60

Dieses Primerpaar führt zur Amplifikation der für die Aminosäurereste 70—194 (korrespondierend mit bp 298—672) des OPG-Leserahmens kodierenden Region der murinen OPG-cDNA. Der 3'-Primer enthält eine NtI-Restriktionsstelle, die mit der im Leserahmen befindlichen NtI-Stelle des Fc-Fusionsvektors pFcA3 kompatibel ist. Das Produkt deckt ferner eine am bp 436 lokalisierte einmalige EcoRI-Restriktionsstelle ab. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde wie oben beschrieben in den murine OPG[1-401] Fc-Fusionsvektor kloniert. Der resultierende, auf pCEP4-basierende Expressionsvektor kodiert für die OPG-Reste 1—194, direkt gefolgt von sämtlichen 227 Aminosäureresten der humanen IgG1 Fc-Region. Der murine OPG 1—194.Fc-Fusionsvek-

DE 196 54 610 A1

t r wurde mittels Transfektion in 293-Zellen eingeführt, bevor eine Arzneimittel-Selektion erfolgte und das konditionierte Medium produziert wurde. Das resultierende sekretierte Fusionsprodukt wurde nach den Empfehlungen des Herstellers mittels Protein-A-Säulenchromatographie (Pierce) gereinigt.

Das Konstrukt der Fusion der für die Aminosäuren 1–401 kodierenden humanen OPG-DNA mit der Fc-Region von humanem IgG1 wurde wie folgt geschaffen. Die humane OPG-DNA im Plasmid pRcCMV-hu Osteoprotegerin (in Beispiel 5 beschrieben) wurde unter Verwendung der folgenden Oligonukleotidprimer amplifiziert:

1254-90:

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTG GTT TCC GGG GAC CAC AAT G-3'
(SEQ ID NO: 36)

5

10

15

1254-95:

5'-CCT CTG CGG CCG CTA AGC AGC TTA TTT TTA CTG AAT GG-3'
(SEQ ID NO: 37)

20

25

Das resultierende PCR-Produkt kodiert für das humane OPG-Protein vollständiger Länge und schafft eine NotI-Restriktionsstelle, die mit der im Leserahmen befindlichen NotI-Stelle des Fc-Fusionsvektors FcA3 kompatibel ist. Das PCR-Produkt wurde wie oben beschrieben direkional in den Plasmidvektor pCEP4 kloniert. Der resultierende Expressionsvektor kodiert für die Reste 1–401 von humanem OPG, direkt gefolgt von 227 Aminosäureresten der humanen IgG1 Fc-Region. Konditioniertes Medium von transfizierten und Arzneimittel-selektierten Zellen wurde produziert, und das huOPG F1.Fc-Fusionsprodukt wurde nach den Empfehlungen des Herstellers mittels Protein-A-Säulenchromatographie (Pierce) gereinigt.

Das Konstrukt der Fusion der für die Aminosäurereste 1–201 kodierenden humanen OPG-DNA mit der Fc-Region von humanem IgG1 [huOPG Ct(201).Fc] wurde wie folgt geschaffen. Die klonierte humane OPG-cDNA des Plasmids pRrCMV-hu Osteoprotegerin wurde mittels PCR unter Verwendung des Oligonukleotid-Primerpaars amplifiziert:

30

35

1254-90:

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTG GTT TCC GGG GAC CAC AAT G-3'
(SEQ ID NO: 38)

40

35

1254-92:

5'-CCT CTG CGG CCG CCA GGG TAA CAT CTA TTC CAC-3'
(SEQ ID NO: 39)

45

40

Dieses Primerpaar führt zur Amplifikation der für die Aminosäurereste 1–201 des OPG-Leserahmens kodierenden Region der humanen OPG-cDNA und schafft am 3'-Ende eine NotI-Restriktionsstelle, die mit der im Leserahmen befindlichen NotI-Stelle des Fc-Fusionsvektors FcA3 kompatibel ist. Dieses Produkt kodiert im Falle der Verknüpfung mit dem Fc-Anteil für die OPG-Reste 1–201, direkt gefolgt von sämtlichen 221 Aminosäureresten der humanen IgG1 Fc-Region. Das PCR-Produkt wurde wie oben beschrieben direkional in den Plasmidvektor pCEP4 kloniert. Konditioniertes Medium von transfizierten und Arzneimittel-selektierten Zellen wurde produziert, und die huOPG Ct(201).Fc-Fusionsprodukte wurden nach den Empfehlungen des Herstellers mittels Protein-A-Säulenchromatographie (Pierce) gereinigt.

50

55

Die folgenden Vorgehensweisen wurden zur Herstellung und Expression von unfusioniertem murinen und humanen OPG angewendet.

Ein Plasmid für die Expression von murinem OPG vollständiger Länge (Reste 1–401) in Säugern wurde geschaffen durch PCR-Amplifikation des murinen OPG-cDNA-Inserts von pRcCMV Mu-Osteoprotegerin und Subklonierung in den Expressionsvektor pDSR α (DeClerck et al., J. Biol. Chem. 266, 3893 (1991)). Die folgenden Oligonukleotidprimer wurden eingesetzt:

60

55

65

DE 196 54 610 A1

1295-26:

5' -CCG AAG CTT CCA CCA TGA ACA AGT GGC TGT GCT GC-3'

(SEQ ID NO: 40)

1295-27:

10 5' -CCT CTG TCG ACT ATT ATA AGC AGC TTA TTT TCA CGG ATT G-3'

(SEQ ID NO: 41)

15 Der Leserahmen für murines OPG vollständiger Länge wurde mittels PCR wie oben beschrieben amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde gereinigt und entsprechend den Empfehlungen des Herstellers mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XbaI (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) gespalten und anschließend mit mittels HindIII und XbaI gespaltenem pDSRa ligiert. Der Nachweis rekombinanter Klone erfolgte durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und anschließende Sequenzierung, um sicherzustellen, daß während der PCR-Amplifikation keine Mutationen produziert wurden.

20 Das resultierende Plasmid pDSRa-muOPG wurde durch Calciumvermittelte Transfektion (Wigler et al, Cell 11, 233 (1977)) in Chinesische Hamster Ovary (CHO)-Zellen eingeführt. Individuelle Kolonien wurden auf der Grundlage der Expression des Dihydrofolatreduktase (DHFR)-Gens im Plasmidvektor selektiert, und mehrere Klone wurden isoliert. Die Expression des murinen, rekombinanten OPG-Proteins wurde überwacht durch 25 Western Blot-Analyse des von CHO-Zellen konditionierten Mediums. Hochexprimierende Zellen wurden ausgewählt, und die Expression von OPG wurde weiter amplifiziert durch Behandlung mit Methotrexat wie dargelegt (DeClerck et al, ibid.). Von CHO-Zelllinien konditioniertes Medium wurde produziert zur weiteren Aufreinigung des rekombinanten, sekretierten, murinen OPG-Proteins.

30 Ein Plasmid für die Expression von humanem OPG vollständiger Länge (Aminosäuren 1–401) in Säugern wurde generiert durch Subklonieren des cDNA-Inserts von pRcCMV-hu Osteoprotegerin direkt in den Vektor pDSRa (DeClerck et al, ibid.). Das Plasmid pRcCMV-OPG wurde vollständig mit NotI gespalten, mit Klenow glattendig gemacht und anschließend vollständig mit XbaI verdaut. Die Vektor-DNA wurde mit HindIII gespalten, mit Klenow glattendig gemacht und anschließend mit XbaI verdaut, bevor sie mit dem OPG-Insert ligiert wurde. Rekombinante Plasmide wurden anschließend sequenziert, um die korrekte Orientierung der humanen 35 OPG-cDNA zu bestätigen.

40 Das resultierende Plasmid pDSRa-huOPG wurde wie oben beschrieben in Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen eingeführt. Individuelle Kolonien wurden auf der Grundlage der Expression des Dihydrofolatreduktase (DHFR)-Gens im Plasmidvektor selektiert, und mehrere Klone wurden isoliert. Die Expression des humanen, rekombinanten OPG-Proteins wurde durch Western Blot-Analyse des von CHO-Zellen konditionierten Mediums überwacht. Hochexprimierende Klone wurden ausgewählt, und die Expression von OPG wurde weiter amplifiziert durch Behandlung mit Methotrexat. Das von humanes OPG exprimierenden CHO-Zelllinien 45 konditionierte Medium wurde für die Proteireinigung produziert.

45 Die Herstellung von Expressionsvektoren für die für murines OPG kodierenden Reste 1–185 wurde wie folgt durchgeführt. Murine OPG-cDNA von pRcCMV-Mu OPG wurde unter Verwendung der folgenden Oligonukleotidprimer amplifiziert:

1333-82:

50 5' -TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3'

(SEQ ID NO: 42)

1356-12:

55 5' -CCT CTG TCG ACT TAA CAC ACG TTG TCA TGT GTT GC-3'

(SEQ ID NO: 43)

60 Dieses Primerpaar führt zur Amplifikation der für die Aminosäuren 63–185 des OPG-Leserahmens (bp 278–645) kodierenden Region der murinen OPG-cDNA und enthält ein künstliches Stopkodon direkt nach dem Cysteinkodon (C185), dem eine künstliche SalI-Restriktionsendonukleasestelle folgt. Das vorhergesagte Produkt enthält eine für die Subklonierung in einen bereits existierenden Vektor geeignete interne EcoRI-Restriktionsstelle. Nach der PCR-Amplifikation wurde das resultierende gereinigte Produkt mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und SalI gespalten, und das große Fragment wurde durch Verwendung eines Gels gereinigt. Das gereinigte Produkt wurde anschließend in das große Restriktionsfragment aus einem Verdau des oben beschriebenen pBluescript-muOPG F1Fc mit EcoRI und SalI subkloniert. Das resultierende Plasmid wurde mit HindIII

DE 196 54 610 A1

und Xhol verdaut, und das kleine Fragment wurde durch Verwendung eines Gels gereinigt. Dieses Fragment, welches einen offenen Leserahmen enthält, der für die Reste 1–185 kodiert, wurde anschließend in den mit HindIII und Xhol verdauten Expressionsvektor pCEP4 subkloniert. Der resultierende Vektor pmuOPG [1-185] kodiert für ein verkürztes OPG-Polypeptid, das an dem an Position 185 lokalisierten Cysteinrest endet. Das von transfizierten und Arzneimittel-selektierten Zellen konditionierte Medium wurde wie oben beschrieben produziert. 5

1333-82:

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3'

10

(SEQ ID NO: 44)

1356-13:

5'-CCT CTG TCG ACT TAC TTT TGC GTG GCT TCT CTG TT-3'

15

(SEQ ID NO: 45)

Dieses Primerpaar führt zur Amplifikation der für die Aminosäuren 70–194 des OPG-Leserahmens (bp 298–672) kodierenden Region der murinen OPG-cDNA und enthält ein künstliches Stopkodon direkt nach dem Lysinkodon (K194), dem eine künstliche Sall-Restriktionsendonukleasestelle folgt. Das vorhergesagte Produkt enthält eine zur Subklonierung in einen bereits existierenden Vektor geeignete interne EcoRI-Restriktionsstelle. Nach der PCR-Amplifikation wurde das resultierende gereinigte Produkt mit den Restriktionsendonukleasen 20 EcorI und Sall gespalten, und das große Fragment wurde durch Verwendung eines Gels gereinigt. Das gereinigte Produkt wurde anschließend in das große Restriktionsfragment eines Verdaus des oben beschriebenen pBluescript-muOPG F1.Fc mit EcoRI und Sall subkloniert. Das resultierende Plasmid wurde mit HindIII und Xhol verdaut, und das kleine Fragment wurde durch Verwendung eines Gels gereinigt. Dieses Fragment, welches einen offenen Leserahmen enthält, der für die Reste 1–185 kodiert, wurde anschließend in den mit HindIII und Xhol verdauten Expressionsvektor pCEP4 subkloniert. Der resultierende Vektor pmuOPG [1-185] kodiert für ein verkürztes OPG-Polypeptid, das an einem Lysin an Position 194 endet. Das von transfizierten und Arzneimittel-selektierten Zellen konditionierte Medium wurde wie oben beschrieben produziert. 30

Mehrere Mutationen wurden am 5'-Ende des Gens huOPG [22-401]-Fc generiert, wodurch zwischen den Resten 22 bis 32 von OPG entweder Aminosäuresubstitutionen oder -deletionen eingeführt werden. Sämtliche 35 Mutationen wurden unter Anwendung der vom Hersteller empfohlenen Bedingungen mit dem "QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene, San Diego, CA) generiert. Kurz ausgedrückt, wurde die plasmidäre DNA huOPG [22-401]-Fc als Template und mutogene Primer enthaltende Reaktionsmischung in Gegenwart von Desoxynukleotiden mit Pfu-Polymerase behandelt und anschließend wie oben ausgeführt in einem Thermo- 40 cycler amplifiziert. Ein Aliquot der Reaktion wird anschließend zur Transformation von kompetenten E. coli XL1-Blue durch Hitzeschock eingesetzt, bevor ausplattiert wurde. Die plasmidäre DNA von Transformanten wurde anschließend sequenziert, um Mutationen zu bestätigen.

Die folgenden Primerpaare wurden eingesetzt, um die Reste 22–26 des humanen OPG-Gens zu deletieren, was zur Produktion eines huOPG [27-401]-Fc-Fusionsproteins führt: 45

1436-11:

5'-TGG ACC ACC CAG AAG TAC CTT CAT TAT GAC-3'

50

(SEQ ID NO: 140)

1436-12:

5'-GTC ATA ATG AAG GTA CTT CTG GGT GGT CCA-3'

55

(SEQ ID NO: 141)

Die folgenden Primerpaare wurden eingesetzt, um die Reste 22–28 des humanen OPG-Gens zu deletieren, 60 was zur Produktion eines huOPG [29-401]-Fc-Fusionsproteins führt:

65

DE 196 54 610 A1

1436-17:

5'-GGA CCA CCC AGC TTC ATT ATG ACG AAG AAA C-3'
(SEQ ID NO: 142)

1436-18:

5'-GTT TCT TCG TCA TAA TGA AGC TGG GTG GTC C-3'
(SEQ ID NO: 143)

15 Die folgenden Primerpaare wurden eingesetzt, um die Reste 22–31 des humanen OPG-Gens zu deletieren, was zur Produktion eines huOPG [32-401]-Fc-Fusionsproteins führt:

20 1436-27:

5'-GTG GAC CAC CCA GGA CGA AGA AAC CTC TC-3'
(SEQ ID NO: 144)

25

1436-28:

5'-GAG AGG TTT CTT CGT CCT GGG TGG TCC AC-3'
(SEQ ID NO: 145)

35 Die folgenden Primperpaare wurden eingesetzt, um das Kodon des humanen OPG-Gens für den Tyrosinrest 28 durch ein solches für Phenylalanin auszutauschen, was zur Produktion eines huOPG [22-401]-Fc-Y28F-Fusionsproteins führt:

40 1436-29:

5'-CGT TTC CTC CAA AGT TCC TTC ATT ATG AC-3'
(SEQ ID NO: 146)

45

1436-30:

5'-GTC ATA ATG AAG GAA CTT TGG AGG AAA CG-3'
(SEQ ID NO: 147)

50

Die folgenden Primperpaare wurden eingesetzt, um das Kodon des humanen OPG-Gens für den Prolinrest 26 durch ein solches für Alanin auszutauschen, was zur Produktion eines huOPG [22-401]-Fc-P26A-Fusionsproteins führt:

55

1429-83:

5'-GGA AAC GTT TCC TGC AAA GEA CCT TCA TTA TG-3'
(SEQ ID NO: 148)

60

1429-84:

5'-CAT AAT GAA GGT ACT TTG CAG GAA ACG TTT CC-3'
(SEQ ID NO: 149)

Jedes resultierende, die geignete Mutation enthaltende muOPG [22-401]-Fc-Plasmid wurde anschließend zur Transfektion von humanen 293-Zellen eingesetzt, und das mutante OPG-Fc-Fusionsprotein wurde aus dem konditionierte Medium wie oben beschrieben gereinigt. Die biologische Aktivität eines jeden Proteins wird durch Anwendung des in Beispiel 11 beschriebenen in vitro-Assays zur Osteoklastenbildung analysiert.

5

Beispiel 8

Expression von OPG in E. coli

10

A. Bakterielle Expressionsvektoren

pAMG21

15

Das Expressionsplasmid pAMG21 kann von dem Amgen-Expressionsvektor pCFM1656 (ATCC #69576) abgeleitet werden, welcher wiederum abgeleitet werden kann vom Amgen-Expressionsvektorsystem, das im US-Patent Nr. 4 710 473 beschrieben ist. Das Plasmid pCFM1656 kann abgeleitet werden vom beschriebenen Plasmid pCFM836 (Patent Nr. 4 710 473) durch: (a) Zerstörung der beiden endogenen NdeI-Restriktionsstellen durch Auffüllen der Enden mit dem Enzym T4-Polymerase und anschließende Ligation glatter Enden; (b) Austausch der DNA-Sequenz zwischen den einmaligen AatII- und ClaI-Restriktionsstellen, die den synthetischen PL-Promotor enthalten, durch ein ähnliches Fragment, das erhalten wurde von pCFM636 (Patent Nr. 4 710 473) enthaltend den PL-Promotor

20

25

AatII

5' CTAATTCCGCTCTCACCTACCAAACAATGCCCGGCTGCAAAAAAATAATTCAATAT-
3' TGCAGATTAAGGCAGAGTGGATGGTTGTTACGGGGGACGTTTATTAAGTATA-

30

-AAAAAACATACAGATAACCACATGCGGTGATAAAATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAA-
-TTTTTGATGTCTATTGGTAGACGCCACTATTAATAGAGACCGCCACACTGTATTT-

35

-TACCACTGGCGGTGATACTGAGCACAT 3' 3' (SEQ ID NO: 53)
-ATGGTGACCGCCACTATGACTCGTGTAGCS' 5' (SEQ ID NO: 54)

ClaI

und anschließendes (c) Substituieren der kleinen DNA-Sequenz zwischen den einmaligen ClaI- und KpnI-Restriktionsstellen durch das folgende Oligonukleotid:

40

5' CGATTGATTCTAGAAGGGAGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTAC3'
(SEQ ID NO: 48) 45

3' TAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGAACCTTAAGC 5'

KpnI

50

ClaI
(SEQ ID NO: 49)

Das Expressionsplasmid pAMG21 kann anschließend abgeleitet werden von pCFM1656 durch Schaffung einer Reihe von ortsspezifischen Basenaustauschen durch PCR-überlappende Oligomutagenese und DNA-Sequenzsubstitutionen. Beginnend mit der BglII-Stelle (Plasmid bp #180) unmittelbar 5, vom Plasmid-Replikationspromotor PcopB und voranschreitend in Richtung der Replikationsgene des Plasmids sind die Basenpaar austausche wie folgt:

55

60

65

DE 196 54 610 A1

	<u>pAMG21 bp #</u>	<u>bp in pCFM1656</u>	<u>Basenpaar-Austausch in pAMG21</u>
5	# 204	T/A	C/G
	# 428	A/T	G/C
	# 509	G/C	A/T
	# 617	-	Insertiere zwei G/C-bp
	# 679	G/C	
	# 980	T/A	C/G
	# 994	G/C	A/T
10	# 1004	A/T	C/G
	# 1007	C/G	T/A
	# 1028	A/T	T/A
	# 1047	C/G	T/A
	# 1178	G/C	T/A
	# 1466	G/C	T/A
	# 2028	G/C	bp-Deletion
15	# 2187	C/G	T/A
	# 2480	A/T	T/A
	# 2499-2502	AGTG TCAC	GTCA CAGT
	# 2642	TCCGAGC AGGCTCG	Deletion von 7 bp
25	# 3435	G/C	A/T
	# 3446	G/C	A/T
	# 3643	A/T	T/A

Die DNA-Sequenz zwischen den einmaligen AatII (Position # 4364 in pCFM1656)- und SacII (Position # 4585 in pCFM1656)-Restriktionsstellen wird substituiert mit der folgenden DNA-Sequenz:

[klebriges AatII-Ende] (Position #4358 in pAMG21)	5' GCGTAACGTATGCATGGCTC 3' TGCACGCATTGCATACTGACAGAGG -CCATGCGAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACT -GGTACGCTCTCATCCCTGACGGTCCGTAGTTATTTGCTTCCGAGTCAGCTTCTGA -GGGCTTTCGTTTATCTGTTGTCGGTGAACGCTCTCTGAGTAGGACAATCCG -CCCGGAAAGCAAAATAGACAACAAACAGCCACTTGGAGAGGACTCATCCTGTTAGGCG -CGGGAGCGGATTTAACGTTGCGAAGCAACGGCCCCGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCGC -GCCCTCGCTAAACTGCAACGCTTGCCTGCCACCGCCCCGCTGGGGCG -CATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCTTTTGC -GTATTTGACGGTCCGTAGTTATCGTCTCCGGTAGGACTGCCTACCGAAAAACGCA AatII -TTCTACAAACTCTTTGTTATTTCTAAATACATTCAAATATGGACGTCGTACTTAAC -AAGATGTTGAGAAAACAATAAAAGATTATGTAAGTTATACCTGCAGCATGAATTG -TTTTAAAGTATGGGCAATCAATTGCTCCTGTTAAAATTGCTTTAGAAATACTTGGCAGC -AAAATTCATACCCGTTAGTTAACGAGGACAATTAAACGAAATCTTATGAAACCGTCG -GGTTTGTGTATTGAGTTCAATTGCGCATTGGTTAAATGGAAAGTGACCGTGCGCTTAC -CCAAACAACATAACTCAAAGTAAACGCGTAACCAATTACCTTCACTGGCACGCGAATG -TACAGCCTAATATTGAAATATCCAAGAGCTTTCCCTCGCATGCCACGCTAAAC -ATGTCGGATTATAAAAACCTTTAGGGTCTCGAAAAAGGAAGCGTACGGGTGCGATTG -ATTCTTTCTCTTTGGTTAAATCGTTGTTGATTATTATTTGCTATATTATTTTC -TAAGAAAAAGAGAAAACCAATTAGCAACAACTAAATAACGATATAAAAG
--	---

DE 196 54 610 A1

-GATAATTATCAACTAGAGAAGGAACAATTAAATGGTATGTCATACACGCATGTAAAAATA-
 -CTATTAATAGTTGATCTCTCCTTGTAAATTACCATACAAGTATGTGCGTACATTTTAT-
 -AACTATCTATATAGTTGCTTCTCTGAATGTGCAAAACTAAGCATTCCGAAGCCATTAT-
 -TTGATAGATATATCAACAGAAAGAGACTTACACGTTTGATTGTAAGGCTTCGGTAATA- 5
 -TAGCAGTATGAATAGGGAAACTAAACCCAGTGATAAGACCTGATGATTCGCTCTTAA-
 -ATCGTCATACTTATCCCTTGATTTGGGTCACTATTCTGGACTACTAAAGCGAAGAAATT-
 -TTACATTTGGAGATTTTATTACAGCATTGTTCAAATATATTCCAATTAAATCGGTG-
 -AATGTAACCTCTAAAAAATAAATGCGTAACAAAAGTTATATAAGGTTAATTAGCCAC- 10
 -AAIGATTGGAGTTAGAATAATCTACTATAGGATCATTTTATAAATTAGCGTCATCAT-
 -TTACTAACCTCAATCTTATTAGATGATATCCTAGTATAAAATAATTAAATCGCAGTAGTA- 15
 -AAATATTGCCCTCCATTAGGTAATTATCCAGAATTGAAATATCAGATTAAACCATAG-
 -TTATAACGGAGGTAAAAAATCCCATTAAATAGGCTTAACCTTATAGTCTAAATTGGTATC-
 -AAATGAGGATAAAATGATCGCGAGTAAATAATATTACAATGTACCATTTAGTCATATCAG- 20
 -TTACTCCTATTTACTAGCGTCATTTATTATAAGTGTACATGGTAAATCAGTATAAGTC-
 -ATAAGCATTGATTAATATCATTATTGCTTCTACAGGCTTAATTAAATTATTCTGT-
 -TATTCGTAACTAATTATAGTAATAACGAAGATGTCCGAAATTAAATAATTAAAGACA- 25
 -AAAGTGTGTCGGCATTATGTCCTTCAACCCATCTTTATCCTTACCTATTGTTGIC-
 -TTCACAGCAGCCGTAACAGAAAGTATGGTAGAGAAATAGGAATGGATAACAAACAG-
 -GCAAGTTTGCGTGTATATATCATTAAACGGTAATAGATTGACATTGATTCTAATAA-
 -CGTTCAAAACGCACAATATATAGTAATTGCCCCATTATCTAATGTAACACTAAGATTATT- 30
 -ATTGGATTTGTCACACTATTATATCGCTTGAATACAATTGTTAACATAAGTACCTG-
 -TAACCTAAAAACAGTGTGATAATATAGCGAACCTTATGTTAACAAATTGTATTGAC-
 -TAGGATCGTACAGGTTACGCAAGAAAATGGTTGTTAGTCGATTAATCGATTGATT- 35
 -ATCCTAGCATGTCCTTACGCTTACCAACATATCAGCTAATTAGCTAAACTAA-
 -CTAGATTTGTTTAACTAATTAAAGGAGGAATAACATATGGTTAACCGCGTTGGAATTCGA-
 -GATCTAAACAAAATTGATTAATTCCCTCTTATTGTATACCAATTGCGAACCTTAAGCT- 40

SacII

 -GCTCACTAGTGTGACCTGCAGGGTACCATGGAAAGCTTACTCGAGGATCCCGGAAAGAA-
 -CGAGTGATCACAGCTGGACGTCCTGGTACCTTCGAATGAGCTCCTAGGCGCTTTCTT- 45
 -GAAGAAGAAGAAGAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA-
 -CTTCTTCTTCTTCTTCCGGCTTCCCTCGACTCAACCGACGACGGTGGCGACTCGTTAT-
 -ACTAGCATAACCCCTGGGCCTCTAACGGCTTGAGGGTTTTGCTGAAAGGAGG-
 -TGATCGTATTGGGAACCCGGAGATTGCCCAGAACCTCCAAAAACGACTTCCCTCC- 50
 -AACCGCTCTCACGCTCTCACGC 3' [klebriges SacII-Ende] (SEQ ID NO: 50)
 -TTGGCGAGAAGTGCAGAAGTG 5' (Position #5904 in pAMG21) (SEQ ID NO: 46) 55

Während der Ligation der klebrigen Enden dieser Substitutions-DNA-Sequenz werden die außen befindlichen AatII- und SacII-Stellen zerstört. In der substituierten DNA gibt es einmalige AatII- und SacII-Stellen.

pAMG22-His

60

Das Expressionsplasmid pAMG22-His kann von dem Amgen-Expressionsvektor pAMG22 abgeleitet werden durch Substitution der kleinen DNA-Sequenz zwischen den einmaligen NdeI (# 4795)- und EcoRI (# 4818)-Restriktionsstellen von pAMG22 mit dem folgenden Oligonukleotid-Duplex:

65

DE 196 54 610 A1

NdeI NheI Ec RI
5' TATGAAACATCATCACCATCACCATCATGCTAGCGTTAACGC GTTGG 3'
(SEQ ID NO: 51)

3' ACTTTGTAGTAGTGGTAGTGGTAGTACGATCGCAATTGCGAACCTTAA 5'
(SEQ ID NO: 52)

Met-Lys-His-His-His-His-His-His-Ala-Ser-Val-Ala-Ser-Ala-Lys-Glu

(SEQ ID NO: 168)

RAMG22

- 20 Das Expressionsplasmid pAMG22 kann abgeleitet werden vom Amgen-Expressionsvektor pCFM1656
(ATCC #69576), der wiederum vom Amgen-Expressionsvektorsystem gemäß Darlegung im am 1. Dezember
1987 erteilten US-Patent Nr. 4 710 473 abgeleitet werden kann. Das Plasmid pCFM1656 kann abgeleitet werden
von dem beschriebenen Plasmid pCFM836 (Patent Nr. 4 710 473) durch: (a) Zerstörung der beiden endogenen
NdeI-Restriktionsstellen durch Auffüllen der Enden mit dem Enzym T4-Polymerase und nachfolgende Ligation
glatter Enden; (b) Austausch der den synthetischen PL-Promotor enthaltenden DNA-Sequenz zwischen den
einmaligen AatII- und Clal-Restriktionsstellen durch ein ähnliches Fragment, erhalten von pCFM636 (Patent Nr.
25 4 710 473) enthaltend den PL-Promotor

Act II

5' CTAATTCCGCTCTCACCTACCAACAAATGCCCGCTGCAAAAAATAATTATCATAT-
3' TGCAGATTAAGCGAGAGTGGATGGTTACGGGGGGACGTTTTTATTAAGTATA-
-AAAAAACATACAGATAACCATCTGCGGTGATAAATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAA-
-TTTTTGATGCTATTGGTAGACGCCACTATTAATAGAGACCGCCACAACGTGTATTT-

-TACCACTGGCGGTGATACTGAGCACAT 3' 3' (SEQ ID NO: 53)
-ATGGTGACCGCCACTATGACTCGTGTAGCS' 5' (SEQ ID NO: 54)

clar

und anschließendes (c) Substituieren der kleinen DNA-Sequenz zwischen den einmaligen *Cla*I- und *Kpn*I-Restriktionsstellen mit dem folgenden Oligonukleotid:

50 5' CGATTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGGTTAACCGCGTTGGAATTCGGTAC 3'
(SEQ ID NO: 55)

3' TAAACTAAGAT

ClaI **KpnI**
(SEQ ID NO: 56)

ClaI **KpnI**

(SEQ ID NO: 56)

Kpal

- Das Expressionsplasmid pAMG22 kann anschließend abgeleitet werden von pCFM165 durch Scharfung einer Reihe von ortsspezifischen Basenaustauschen durch PCR-überlappende Oligomutagenese und DNA-Sequenzsubstitutionen. Beginnend mit der BglII-Stelle (Plasmid bp # 180) unmittelbar 5' vom Replikationspromotor P_{CopB} des Plasmids und voranschreitend in Richtung der Replikationsgene des Plasmids sind die Basenpaar-austausche wie folgt:

DE 196 54 610 A1

<u>pAMG22 bp #</u>	<u>bp in pCFM1656</u>	<u>bp-Austausche in pAMG22</u>	
# 204	T/A	C/G	
# 428	A/T	G/C	
# 509	G/C	A/T	5
# 617	-	Insertiere zwei G/C-bp	
# 679	G/C	T/A	
# 980	T/A	C/G	
# 994	G/C	A/T	
# 1004	A/T	C/G	10
# 1007	C/G	T/A	
# 1028	A/T	T/A	
# 1047	C/G	T/A	
# 1178	G/C	T/A	
# 1466	G/C	T/A	15
# 2028	G/C	bp-Deletion	
# 2187	C/G	T/A	
# 2480	A/T	T/A	20
# 2499-2502	AGTG TCAC	GTCA CAGT	
# 2642	TCCGAGC AGGCTCG	Deletion von 7 bp	25
# 3435	G/C	A/T	
# 3446	G/C	A/T	
# 3643	A/T	T/A	30

Die DNA-Sequenz zwischen den einmaligen AatII (Position #4364 in pCFM1656)- und SacII (Position #4585 in pCFM1656)-Restriktionsstellen wird substituiert mit der folgenden DNA-Sequenz:

35

40

45

50

55

60

65

DE 196 54 610 A1

[Klebrig's AatII-Ende] (Position #4358 in pAMG22)

5' GCGTAACGTATGCATGGCTCCCCATGCGAGAGTAGGAACTGCCAGGCATCAA-
 3' TGCACGCATTGCATACTGTACCGAGGGTACGCTCTCATCCCTGACGGTCCGTAGTT-
 -ATAAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAGACTGGGCCCTTCGTTTATCTGTTGTTGTCGGTG-
 -TATTTGCTTCCGAGTCAGCTCTGACCCGAAAGCAAAATAGACAACAAACAGCCAC-
 10 -AACGCTCTCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTGAACTGCGAAGCAACGG-
 -TTGCGAGAGGACTCATCTGTTAGGCGCCCTGCCCTAAACTGCAACGCTTCGTMGCC-
 -CCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAGCAGAAG-
 -GGGCCTCCCACCGCCGTCCGTGGCGGTATTTGACGGTCCGTAGTTAATTGCTTC-
 15 -GCCATCCTGACGGATGCCCTTTGCGTTCTACAAACTCTTGTAACTTTCTAAAT-
 -CGGTAAGGACTGCCTACCGAAAAACGAAAGATGTTGAGAAAACAAATAAAAGATTAA-
 20 **Aat II**
 -ACATTCAAAATATGGACGTCTCATATTAAAAATTCAATTGACAAATGCTAAAATTC-
 -TGTAAAGTTATACCTGCAGAGTATTAAAAATTTTAAGTAAACTGTTACGATTAAAG-
 25 -TTGATTAATATTCTCAATTGTGAGCGCTCACAAATTATCGATTGATTCTAGATTGTT-
 -AACTAATTATAAGAGTTAACACTCGCGAGTGTAAATAGCTAAACTAAGATCTAACTCA-
 -TAACTAATTAAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCCGTGGAATTGAGCTCACTAGTGT-
 -ATTGATTAATTCCCTCCTATTGTATACCAATTGCGAACCTTAAGCTCGAGTGTACACA-
 30 **Sac II**
 -CGACCTGCAGGGTACCATGGAAGCTTACTCGAGGATCCGCCGGAAAGAAGAAGAAGAAGA-
 -GCTGGACGTCCCATGGTACCTTCGAATGAGCTCCTAGGCGCCTTCTCTCTCTCTT-
 35 -GAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACC-
 -CTTCGGGCTTCCCTCGACTCAACCGACGACGGTGGCGACTCGTTATTGATCGATTGG-
 -CCTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGTTTGTGAAAGGAGGAACCGCTCTCA-
 -GGAACCCCGGAGATTGCCCCAGAACTCCCCAAAAACGACTTCCCTGGCGAGAAGT-
 40 -CGCTCTTCACGC 3'
 -GCGAGAAGTG 5'
 3' (SEQ ID NO: 58)
 5' (SEQ ID NO: 57)

[Klebrig's SacII-Ende] (Position #5024 in pAMG22)

50 Während der Ligation der klebrigen Enden dieser Substitutions-DNA-Sequenz werden die außen befindlichen AatII- und SacII-Stellen zerstort. In der substituierten DNA gibt es einmalige AatII- und SacII-Stellen.

B. Human OPG Met[32-401]

55 In dem Beispiel war der verwendete Expressionsvektor pAMG21, ein Derivat von pCFM1656 (ATCC-Zugriffsnummer 69576), welcher für die Insertion von Genen stromabwärts des lux PR-Promoters geeignete Restriktionsstellen enthält. (Zur Beschreibung des lux-Expressionssystems, siehe US-Patent Nr. 5 169 318). Die eingesetzte Wirtszelle war GM120 (ATCC-Zugriffsnummer 55764). Dieser Wirt besitzt den Promotor lacIQ und das Gen lacI integriert in eine zweite Stelle im Wirtschromosom eines prototrophen *E. coli* K12-Wirtes. Andere, 60 üblicherweise eingesetzte *E. coli*-Expressionsvektoren und Wirtszellen sind für die Expression ebenfalls geeignet.

Eine für ein N-terminales Methionin und die Aminosäuren 32–401 des humanen OPG-Polypeptids kodierende DNA-Sequenz wurde in den Plasmid-Expressionsvektor pAMG21 unter Kontrolle des Promoters luxPR wie folgt plaziert. Hierfür wurde eine PCR unter Verwendung der Oligonukleotide # 1257-20 und # 1257-19 als Primer durchgeführt, wobei als Template plasmidäre pRcCMV-Hu OPG-DNA, die die humane OPG-cDNA enthält, eingesetzt und ein Thermocycling über 30 Zyklen durchgeführt wurde, wobei jeder Zyklus umfaßte: 94°C für 20 Sekunden, gefolgt von 30 Sekunden bei 37°C, gefolgt von 30 Sekunden bei 72°C. Die resultierende PCR-Probe wurde auf ein Agarosegel aufgetrennt, das PCR-Produkt wurde ausgeschnitten, gereinigt, mit

den Restriktionsend nukleasen KpnI und BamHI restringiert und gereinigt. Die synthetischen Oligonukleotide # 1257-21 und # 1257-22 wurden unter Verwendung von T4 Polynukleotid-Kinase und ATP einzeln phosphoryliert und anschließend miteinander vermischt sowie auf 94°C erhitzt, bevor man sie langsam auf Raumtemperatur abkühlen ließ, um einen Oligonukleotid-Linker-Duplex zu bilden, der klebrige NdeI- und KpnI-Enden enthält. Der phosphorylierte Linker-Duplex, gebildet zwischen den die klebrigen NdeI- und KpnI-Enden enthaltenden Oligonukleotide # 1257-21 und # 1257-22 (siehe Fig. 14A), und das mit KpnI und BamHI verdaute und gereinigte, unter Verwendung der Oligoprimer # 1257-20 und # 1257-19 generierte gereinigte PCR-Produkt (siehe oben) wurde direkional zwischen zwei Stellen des Plasmidvektors pAMG21 insertiert, nämlich der NdeI-Stelle und der BamHI-Stelle, wobei Standardverfahren der rekombinanten DNA-Technologie angewendet wurden (siehe Fig. 14A und nachfolgende Sequenzen). Der synthetische Linker nutzte E. coli-Kodons und stellte ein N-terminales Methionin bereit.

Zwei Klone wurden ausgewählt und die plasmidäre DNA wurde isoliert, und das humane OPG-Insert wurde hinsichtlich seiner DNA-Sequenz anschließend bestätigt. Das resultierende Plasmid pAMG21, das die Aminosäuren 32-401 des humanen OPG-Polypeptids enthält, und dem unmittelbar vorher im Leserahmen ein Methionin vorausgeht, wird bezeichnet mit pAMG21-huOPG met[32-401] oder pAMG21-huOPG met[32-401].

Oligo#1257-19

5'-TACGCACTGGATCCTTATAAGCAGCTTATTTTACTGATTGGAC-3'

(SEQ ID NO: 59)

Oligo#1257-20

5'-GTCCTCCTGGTACCTACCTAAACAAAC-3'

(SEQ ID NO: 60)

Oligo#1257-21

5'-TATGGATGAAGAAACTTCTCATCAGCTGCTGTGATAAAATGTCC
GCCGGGTAC -3'

(SEQ ID NO: 61)

Oligo#1257-22

5'-CCGGCGGACATTATCACACAGCAGCTCATGAGAAGTTCTCATCCA-3'

(SEQ ID NO: 62)

Kulturen von pAMG21-huOPG met[32-401] in E. coli GM120 wurden in 20 µg/ml Kanamycin enthaltendem 2X YT-Medium vor der Induktion bei 30°C inkubiert. Die Induktion der Expression des huOPG met[32-401]-Genprodukts vom Promotor luxPR wurde erreicht im Anschluß an die Zugabe des synthetischen Autoinduktionsmittels N-(3-Oxohexanoyl)-DL-homoserinlacton zum Kulturmedium in einer Endkonzentration von 30 ng/ml sowie durch Inkubation der Kulturen für weitere 6 Stunden bei entweder 30°C oder 37°C. Nach 6 Stunden wurden die bakteriellen Kulturen mikroskopisch auf die Anwesenheit von Einschlußkörpern untersucht und anschließend durch Zentrifugation pelletiert. In induzierten Kulturen wurden refraktäre Einschlußkörper beobachtet, was darauf hinweist, daß eine gewisse Menge des rekombinanten huOPG met[32-401]-Genprodukts in E. coli in unlöslicher Form produziert wurde. Einige bakterielle Niederschläge wurden in 10 mM Tris-HCl/pH-Wert 8, 1 mM EDTA resuspendiert und direkt lysiert durch Zugabe von 2X Laemmli-Probenpuffer auf eine Endkonzentration von IX und von β-Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 5%, bevor mittels SDS-PAGE analysiert wurde. Gegenüber der Spur 2 eines SDS-PAGE-Gels, in der sich ein Gesamt-Zellsatz einer bei 30°C nichtinduzierten Kultur befand, wurde in einem Bereich des Gels, der Gesamt-Zellsatz von bei 30°C und bei 37°C induzierten Kulturen enthielt, eine wesentlich intensiver mit Coomassieblau gefärbte Band von ungefähr 42 kD beobachtet (Fig. 14B). Das erwartete Genprodukt würde eine Länge von 370 Aminosäuren und ein erwartetes M_r kDa von etwa 42,2 kDa aufweisen. Im Anschluß an die Induktion bei 37°C für eine Zeitspanne von 6 Stunden wurde eine zusätzliche Kultur pelletiert und entweder zur Isolierung von Einschlußkörpern (siehe unten) oder durch Mikrofluidisation weiterverarbeitet. Der für die Mikrofluidisation aufbereitet Niederschlag wurde in 25 mM Tris-HCl/pH-Wert 8, 0,5 M NaCl-Puffer resuspendiert und 20-mal durch einen Microfluidizer Model 1108 (Microfluidics Corp.) geleitet und gesammelt. Ein Aliquot der gesammelten Probe (mikrofluidisiertes Gesamtlysat) wurde entnommen, und der Rest wurde 20 Minuten lang bei 20 000 × g sedimentiert. Im Anschluß an die Zentrifugation wurde der Überstand entfernt (mikrofluidisierte lösliche

DE 196 54 610 A1

Faktion), und der Niederschlag wurde in einer Lösung von 25 mM Tris-HCl/pH-Wert 8, 0,5 M NaCl, 6 M Harnstoff resuspendiert (mikrofluidisierte unlösliche Fraktion). Einem Aliquot entweder der löslichen oder unlöslichen Gesamtfaktion wurden ein gleiches Volumen 2X Laemmli-Probenpuffer und β-Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 5% zugegeben. Die Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE analysiert. In der unlöslichen Fraktion war offenbar eine signifikante Menge an rekombinantem huOPG met[32-401]-Genprodukt vorhanden. Für die Aufreinigung des rekombinanten Proteins wurden die Einschlußkörper wie folgt gereinigt:

Bakterielle Zellen wurden vom Medium abgetrennt durch eine 15 Minuten lange Dichtegradientenzentrifugation in einer mit einem JS-4.2-Rotor ausgerüsteten Beckman J-6B-Zentrifuge mit $4900 \times g$ bei 4°C . Das bakterielle Sediment wurde in 5 ml Wasser resuspendiert und anschließend mit Wasser auf ein Endvolumen von 10 ml verdünnt. Diese Suspension wurde in ein auf Eis gekühltes Edelstahlgefäß überführt und unter Verwendung eines mit einer Standardspitze ausgestatteten Sonifiziergerätes von Branson einem Sonifikationsaufschluß zugeführt (Leistungseinstellung = 5, Arbeitszyklus = 95%, 80 Bursts). Die sonifizierte Zellsuspension wurde 5 bis 10 Minuten lang bei 23°C in einer mit einem TLA 100.3-Rotor ausgerüsteten Ultrazentrifuge des Typs Optima TLX von Beckman bei $195\,000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und der Niederschlag wurde mit einem Wasserstrom aus einer Spritzflasche gespült. Die Niederschläge wurden durch Abschaben mit einem Mikroschachtel gesammelt und in einen gläsernen Homogenisator überführt (15 ml Kapazität). Dem Homogenisator wurden 5 ml Percoll-Lösung (75% flüssiges Percoll, 0,15 M Natriumchlorid) zugegeben, und der Inhalt wurde bis zum Erhalt einer gleichförmigen Suspension homogenisiert. Das Volumen wurde durch Zugabe von Percoll-Lösung auf 19,5 ml erhöht, vermischt und in 3 Quick-Seal-Röhrchen von Beckman (13 x 32 mm) aufgeteilt. Die Röhrchen wurden nach den Empfehlungen des Herstellers verschlossen. Die Röhrchen wurden 30 Minuten lang in einem TLA 100.3-Rotor von Beckman bei 23°C mit 20 000 UpM ($21\,600 \times g$) zentrifugiert. Die Röhrchen wurden hinsichtlich geeigneter Bandierungsmuster untersucht. Zur Rückgewinnung der refraktären Einschlußkörper wurden die Gradientenfraktionen rückgewonnen und vereinigt und anschließend mit Wasser verdünnt. Die Einschlußkörper wurden durch Zentrifugation sedimentiert, und die Proteinkonzentration wurde nach einer SDS-PAGE ermittelt.

Ein Aliquot der wie nachfolgend beschrieben isolierten Einschlußkörper wurde in 1X Laemmli-Probenpuffer mit 5% β-Mercaptoethanol gelöst und in einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, und die isolierten Einschlußkörper liefern ein hochgereinigtes rekombinantes huOPG [32-401]-Genprodukt. Die nach Auf trennung der Einschlußkörper in einem SDS-Polyacrylamidgel beobachtete Hauptbande von 42 kD wurde aus einem getrennten Gel ausgeschnitten, und die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz erfolgte im wesentlichen wie beschrieben (Matsudaira et al., J. Biol. Chem. 262, 10–35 (1987)). Nach 19 Zyklen wurde die folgende Sequenz bestimmt:



40 Es wurde gefunden, daß diese Sequenz identisch ist mit den ersten 19 Aminosäuren, die von dem Expressionsvektor pAMG21 Hu-OPG met[32-401] kodiert und von einem durch den bakteriellen Expressionsvektor bereitgestellten Methioninrest produziert wurden.

C. Human OPG met[32-401]

45 Eine für ein N-terminales Methionin und die Aminosäuren 22 bis 401 von humanem OPG kodierende DNA-Sequenz wurde wie folgt in einen prokaryontischen Plasmid-Expressionsvektor pAMG21 unter Kontrolle des Promotors luxPR eingebracht. Die isolierte plasmidäre DNA von pAMG21-huOPG met[32-401] (siehe Abschnitt B) wurde mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und BamHI gespalten, und die resultierenden Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. Unter Anwendung von Standardtechniken wurde das B-Fragment (Fragment mit 1064 bp) aus dem Gel isoliert. Synthetische Oligonukleotide (Oligos) #1267-06 und #1267-07 wurden einzeln phosphoryliert und man ließ sie unter Anwendung von in Abschnitt B beschriebenen Verfahren einen Oligo-Linker-Duplex ausbilden, welcher klebrige NdeI- und KpnI-Enden enthielt. Der synthetische Linker-Duplex nutzte E. coli-Kodons und lieferte ein N-terminales Methionin. Der phosphorylierte Oligo-Linker, der kohäsive NdeI- und KpnI-Enden enthält, und das aus dem mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und BamHI verdauten Plasmid pAMG21-huOPG met[32-401] isolierte Fragment mit 1064 bp wurden unter Anwendung von üblichen Verfahren der rekombinanten DNA-Technologie direkional zwischen die NdeI- und BamHI-Stellen von pAMG21 insertiert. Die Ligationsmischung wurde durch Elektroporation unter Anwendung des Protokolls der Lieferfirma zur Transformation von E. coli 393-Wirtszellen verwendet. Klone wurden selektiert, plasmidäre DNA wurde isoliert, und die DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die DNA-Sequenz des Gens huOPG-met[22-401] zu bestätigen.

DE 196 54 610 A1

Oligo #1267-06

5'-TAT GGA AAC TTT TCC TCC AAA ATA TCT TCA TTA TGA TGA AGA
AAC TTC TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TCC GCC GGG TAC-3'
(SEQ ID NO: 63)

5

Oligo #1267-07

5'-CCG GCG GAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAG AAG TTT CTT
CAT CAT AAT GAA GAT ATT TTG GAG GAA AAG TTT CCA-3'
(SEQ ID NO: 64)

10

15

Kulturen der E. coli-393-Wirtszellen mit pAMG21-huOPG-met[22-401] wurden in 20 µg/ml Kanamycin enthaltendes 2X YT-Medium überführt und vor der Induktion bei 30°C inkubiert. Die Induktion der Expression des rekombinanten Genprodukts vom Promotor luxPR des Vektors pAMG21 wurde erreicht durch Zugabe des synthetischen Autoinduktionsmittels N-(3-Oxohexanoyl)-DL-homoserinlacton zum Kulturmedium in einer Endkonzentration von 30 ng/ml und durch Inkubation für weitere 6 Stunden bei entweder 30°C oder 37°C. Nach 6 Stunden wurden die bakteriellen Kulturen durch Zentrifugation sedimentiert (= 30°C I+6 oder 37°C I+6). Die bakteriellen Kulturen wurden ebenfalls entweder kurz vor der Induktion (= 30°C PräI) sedimentiert, oder alternativ wurde einer getrennten Kultur, die man für weitere 6 Stunden zum Erhalt einer nicht-induzierten (UI)-Kultur bei 30 °C inkubierte (= 30°C UI), kein Autoinduktionsmittel zugegeben. Die bakteriellen Sedimente der Kulturen 30°C PräI, 30°C UI, 30°C I+6 oder 37°C I+6 wurden resuspendiert, lysiert und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) gemäß Darlegung in Abschnitt B analysiert. Die Polyacrylamidgele wurden entweder mit Coomassieblau gefärbt und/oder für einen Western Blot auf Nitrocellulose überführt und einer Immunreaktion mit polyklonalem Anti-muOPG-Fc-Antikörper des Kaninchens gemäß Darlegung in Beispiel 10 ausgesetzt. Die Menge an Genprodukt nach der Induktion wurde entweder mit einer nicht-induzierten (30°C UI) oder einer Präinduktions (30°C PräI)-Probe verglichen.

20

25

30

35

D. Murine OPG met [22-401]

Eine für ein N-terminales Methionin und die Aminosäuren 22 bis 401 des murinen (mu) OPG (OPG)-Polypeptids kodierende DNA-Sequenz wurde in einen prokaryontischen Plasmid-Expressionsvektor pAMG21 unter Kontrolle des Promotors luxPR wie folgt eingebracht. Unter Anwendung der in Abschnitt B beschriebenen thermocyclischen Bedingungen wurde eine PCR durchgeführt, bei der die Oligonukleotide # 1257-16 und # 1257-15 als Primer und plasmidäre pRcCMV-Mu-OPG-DNA als Template eingesetzt wurden. Das PCR-Produkt wurde gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und BamHI gemäß Darlegung in Abschnitt B gespalten. Die synthetischen Oligos # 1260-61 und # 1260-82 wurden einzeln phosphoryliert, und man ließ sie unter Anwendung von in Abschnitt B beschriebenen Verfahren einen Oligo-Linker-Duplex mit kohäsiven NdeI- und KpnI-Enden ausbilden. Der synthetische Linker-Duplex nutzte E. coli-Kodons und lieferte ein N-terminales Methionin. Der zwischen den kohäsiven NdeI- und KpnI-Enden aufweisenden Oligos # 1260-61 und # 1260-82 gebildete phosphorylierte Linker-Duplex und das unter Verwendung der Oligoprimer # 1257-16 und # 1257-15 generierte, mit KpnI und BamHI verdaute und gereinigte PCR-Produkt wurden unter Anwendung von Standardverfahren direkional zwischen die NdeI- und BamHI-Stellen von pAMG21 insertiert. Die Ligationsmischung wurde zur Transformation durch Elektroporation nach den Angaben der Lieferfirma in E. coli-393-Wirtszellen eingeführt. Klone wurden selektiert, plasmidäre DNA wurde isoliert, und die DNA-Sequenzierung erfolgte, um die DNA-Sequenz des Gens MuOPG met[22-401] zu bestätigen.

40

45

50

Die Bestimmung der Expression des rekombinanten Polypeptids muOPG met[22-401] aus Kulturen von 393-Zellen mit dem Plasmid pAMG21-MuOPG met[22-401] nach Induktion erfolgte unter Anwendung der im Abschnitt C beschriebenen Verfahren.

55

60

65

DE 196 54 610 A1

Oligo #1257-15

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT AAG CAG CTT ATT TTC ACG
GAT TGA AC-3' (SEQ ID NO: 65)

Oligo #1257-16

10 5'-GTG CTC CTG GTA CCT ACC TAA AAC AGC ACT GCA CAG
TG-3' (SEQ ID NO: 66)

15 Oligo #1260-61

5'-TAT GGA AAC TCT GCC TCC AAA ATA CCT GCA TTA CGA
TCC GGA AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TGC TCC
20 GGG TAC-3' (SEQ ID NO: 67)

25 Oligo #1260-82

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG
30 TTT CCG GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT
CCA-3' (SEQ ID NO: 68)

E. Murine OPG met[32-401]

35 Eine für ein N-terminales Methionin und die Aminosäuren 32 bis 401 von murinem OPG kodierende DNA-Sequenz wurde in einen prokaryontischen Plasmid-Expressionsvektor pAMG21 unter Kontrolle des Promotors luxPR wie folgt eingebracht. Hierfür wurden die synthetischen Oligos # 1267-08 und # 1267-09 unter Anwendung von in Abschnitt B beschriebenen Verfahren einzeln phosphoryliert, und man ließ sie einen Oligo-Linker-Duplex ausbilden. Der synthetische Linker-Duplex nutzte E. coli-Kodons und lieferte ein N-terminales Methionin. Der zwischen den kohäsiven NdeI- und KpnI-Enden enthaltenden Oligos # 1267-08 und # 1267-09 ausgebildete phosphorylierte Linker-Duplex und das zuvor beschriebene (siehe Abschnitt D), mit KpnI und BamHI verdaute und gereinigte PCR-Produkt wurden unter Anwendung von Standardverfahren direktional zwischen die NdeI- und BamHI-Stellen von pAMG21 insertiert. Die Ligationsmischung wurde nach dem Protokoll der Lieferfirma zur Transformation von E. coli-393-Wirtszellen durch Elektroporation verwendet. Klone wurden selektiert, plasmidäre DNA wurde isoliert, und die DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die DNA-Sequenz des Gens muOPG-met[32-401] zu bestätigen.

40 45 Die Expression des rekombinanten Polypeptids muOPG-met[32-401] von Kulturen der 393-Zellen mit dem rekombinanten Plasmid pAMG21 nach Induktion wurde unter Anwendung von im Abschnitt C beschriebenen Verfahren ermittelt.

50 Oligo #1267-08

5'-TAT GGA CCC AGA AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG
55 TGC TCC GGG TAC-3' (SEQ ID NO: 69)

Oligo #1267-09

60 65 5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG TTT CTG
GGT CCA-3' (SEQ ID NO: 70)

F. Murine OPG met-lys[22-401]

65 Eine für ein N-terminales Methionin, gefolgt von einem Lysinrest, und an Aminosäuren 22 bis 401 von murinem OPG kodierende DNA-Sequenz wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pAMG21 unter Kontrolle des Promotors luxPR wie folgt eingebracht. Die synthetischen Oligos #1282-95 und #1282-96

DE 196 54 610 A1

wurden einzeln phosphoryliert, und man ließ sie unter Anwendung von in Abschnitt B beschriebenen Verfahren einen Oligo-Linker-Duplex ausbilden. Der synthetische Linker-Duplex nutzte E. coli-Kodons und lieferte ein N-terminales Methionin. Der zwischen den kohäsiven NdeI- und KpnI-Enden enthaltenden Oligos # 1282-95 und # 1282-96 ausgebildete phosphorylierte Linker-Duplex und das in Abschnitt B beschriebene, mit KpnI und BamHI verdaute und gereinigte PCR-Produkt wurden unter Anwendung von Standardverfahren direktional zwischen die NdeI- und BamHI-Stellen von pAMG21 insertiert. Die Ligationsmischung wurde verwendet zur Transformation von E. coli-393-Wirtszellen durch Elektroporation unter Anwendung des Protokolls der Lieferfirma. Klone wurden selektiert, plasmidäre DNA wurde isoliert, und die DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die DNA-Sequenz des Gens MuOPG-Met-Lys[22-401] zu bestätigen.

Die Expression des rekombinanten Polypeptids MuOPG Met-Lys[22-401] von transformierten 393-Zellen mit dem rekombinanten Plasmid pAMG21 nach Induktion wurde unter Anwendung von in Abschnitt C beschriebenen Verfahren ermittelt.

Oligo #1282-95

5'-TAT GAA AGA AAC TCT GCC TCC AAA ATA CCT GCA TTA CGA TCC
GGA AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TGC TCC GGG TAC-
3' (SEQ ID NO: 71)

15

20

Oligo #1282-96

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG TTT CCG
GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT CTT TCA-3'
(SEQ ID NO: 72)

25

30

G. Murine OPG met-lys-(his)[22-401]

Eine für die N-terminalen Reste Met-Lys-His-His-His-His-His-His (= MKH) und die anschließenden Aminosäuren 22 bis 401 von murinem OPG kodierende DNA-Sequenz wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pAMG21 unter Kontrolle des Promotors luxPR wie folgt eingebracht. Eine PCR wurde durchgeführt, wobei als Primer die Oligonukleotide # 1300-50 und # 1257-15 und als Template DNA des Plasmids pAMG21-muOPG-met[22-401] eingesetzt wurden. Die thermocyclischen Bedingungen waren wie im Abschnitt B beschrieben. Die resultierende PCR-Probe wurde in einem Agarosegel aufgetrennt, und das PCR-Produkt wurde ausgeschnitten, gereinigt, mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und BamHI gespalten und gereinigt. Das unter Verwendung der Oligoprimer # 1300-50 und # 1257-15 generierte, mit NdeI und BamHI verdaute und gereinigte PCR-Produkt wurde unter Anwendung von Standardverfahren der DNA-Technologie direktional zwischen die NdeI- und BamHI-Stellen von pAMG21 insertiert. Die Ligationsmischung wurde verwendet zur Transformation von E. coli-393-Wirtszellen durch Elektroporation unter Anwendung des Protokolls der Lieferfirma. Klone wurden selektiert, plasmidäre DNA wurde isoliert, und eine DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die DNA-Sequenz des Gens muOPG-MKH[22-401] zu bestätigen.

Die Expression des rekombinanten Polypeptids MuOPG-MKH[22-401] von transformierten 393-Zellkulturen mit dem rekombinanten Plasmid pAMG21 nach Induktion wurde unter Anwendung von im Abschnitt C beschriebenen Verfahren ermittelt.

Oligo #1300-50

5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAC ATC ATC ACC ACC ATC ATC ATG AAA
CTC TGC CTC CAA AAT ACC TGC ATT ACG AT-3' (SEQ ID NO: 73)

35

40

45

50

55

Oligo #1257-15

(Siehe Abschnitt D)

60

H. Murine OPG met-lys[22-401](his),

Eine für N-terminale Met-Lys, die Aminosäuren 22 bis 401 von murinem OPG, und 7 Histidinreste im Anschluß an die Aminosäure 401 kodierende DNA-Sequenz (= muOPG MK[22-401]-H7) wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pAMG21 unter Kontrolle des Promotors luxPR wie folgt eingebracht. Ein PCR wurde durchgeführt, bei der als Primer die Oligonukleotide # 1300-49 und # 1300-51 und als Templat pAMG21-muOPG-met[22-401]-DNA eingesetzt wurden. Die thermocyclischen Bedingungen waren wie in Ab-

65

DE 196 54 610 A1

schnitt B beschrieben. Die resultierende PCR-Probe wurde in einem Agarosegel aufgetrennt, und das PCR-Produkt wurde ausgeschnitten, gereinigt, mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und BamHI restriktiert und gereinigt. Das mit NdeI und BamHI verdaute und gereinigte PCR-Produkt wurde unter Anwendung von Standardverfahren zwischen die NdeI- und BamHI-Stellen in pAMG21 insertiert. Die Ligationsmischung wurde verwendet zur Transformation von E. coli-393-Wirtszellen durch Elektroporation nach dem Protokoll der Lieferfirma. Klone wurden selektiert, plasmidäre DNA wurde isoliert, und eine DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die DNA-Sequenz des Gens muOPG MK[22-401]-H, zu bestätigen.

Die Expression des rekombinanten Polypeptids muOPG-MK-[22-401]-H, von transformierten 393-Zellen mit dem rekombinanten Plasmid pAMG21 nach Induktion wurde unter Anwendung von im Abschnitt C beschriebenen Verfahren ermittelt.

Oligo #1300-49

15 5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAG AAA CTC TGC CTC CAA AAT ACC TGC
A-3' (SEQ ID NO: 74)

Oligo #1300-51

20 5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAA TGA TGG TGA TGG TGA TGA TGT AAG
CAG CTT ATT TTC ACG GAT TGA ACC TGA TTC CCT A-3'
25 (SEQ ID NO: 75)

I. Murine OPG met[27-401]

30 Eine für ein N-terminales Methionin und die Aminosäuren 27 bis 401 von murinem OPG kodierende DNA-Sequenz wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pAMG21 unter Kontrolle des Promotors luxPR wie folgt eingebracht. Eine PCR wurde durchgeführt mit den Oligonukleotiden # 1309-74 und # 1257-15 als Primer und plasmidärer pAMG21-muOPG-met[22-401]-DNA als Template. Die thermocyclischen Bedingungen waren wie in Abschnitt B beschrieben. Die resultierende PCR-Probe wurde in einem Agarosegel aufgetrennt, und das PCR-Produkt wurde ausgeschnitten, gereinigt, mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und BamHI gespalten und gereinigt. Das mit NdeI und BamHI verdaute und gereinigte PCR-Produkt wurde unter Anwendung von Standardverfahren direkional zwischen die NdeI- und BamHI-Stellen von pAMG21 insertiert. Die Ligationsmischung wurde verwendet zur Transformation von E. coli-393-Wirtszellen durch Elektroporation nach dem Protokoll der Lieferfirma. Klone wurden selektiert, plasmidäre DNA wurde isoliert, und eine DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die DNA-Sequenz des Gens muOPG-met[27-401] zu bestätigen.

40 Die Expression des rekombinanten Polypeptids muOPG-met[27-401] von einer transfizierten 393-Kultur mit dem rekombinanten Plasmid pAMG21 nach Induktion wurde unter Anwendung der in Abschnitt C beschriebenen Verfahren ermittelt.

Oligo #1309-74

45 5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAT ACC TGC ATT ACG ATC CGG AAA CTG
GTC AT-3' (SEQ ID NO: 76)

Oligo #1257-15

(Siehe Abschnitt D)

J. Human OPG met[27-401]

55 Eine für ein N-terminales Methionin und die Aminosäuren 27 bis 401 von humanem OPG kodierende DNA-Sequenz wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pAMG21, unter Kontrolle des Promotors luxPR wie folgt eingebracht. Eine PCR wurde durchgeführt, wobei als Primer die Oligonukleotide # 1309-75 und # 1309-76 und als Template plasmidäre pAMG21-huOPG-met[22-401]-DNA verwendet wurden. Die thermocyclischen Bedingungen waren wie in Abschnitt B beschrieben. Die resultierende PCR-Probe wurde in einem Agarosegel aufgetrennt, und das PCR-Produkt wurde ausgeschnitten, gereinigt, mit den Restriktionsendonukleasen As I und BamHI restriktiert und gereinigt. Das obige, mit As I und BamHI verdaute und gereinigte PCR-Produkt wurde unter Anwendung von Standardverfahren direkional zwischen die NdeI- und BamHI-Stellen von pAMG21 insertiert. Die Ligationsmischung wurde verwendet zur Transformation von E. coli-393-Wirtszellen durch Elektroporation nach dem Protokoll der Lieferfirma. Klone wurden selektiert, plasmidäre DNA wurde isoliert, und eine DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die DNA-Sequenz des Gens huOPG-

DE 196 54 610 A1

met[27-401] zu bestätigen.

Die Expression des rekombinanten Polypeptids huOPG-met[27-401] nach Induktion von transformierten 393-Zellen mit dem rekombinanten Plasmid pAMG21 wird unter Anwendung von in Abschnitt C beschriebenen Verfahren ermittelt.

5

Oligo #1309-75

5'-GTT CTC CTA TTA ATG AAA TAT CTT CAT TAT GAT GAA GAA ACT
T-3' (SEQ ID NO: 77)

10

Oligo #1309-76

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT AAG CAG CTT ATT TTT ACT GAT T-3'
(SEQ ID NO: 78)

15

K Murine OPG met[22-180]

20

Eine für ein N-terminales Methionin und die Aminosäuren 22 bis 180 von murinem OPG kodierende DNA-Sequenz wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pAMG21 unter Kontrolle des Promotors luxPR wie folgt eingebracht. Eine PCR wurde durchgeführt mit den Oligonukleotiden # 1309-72 und # 1309-73 als Primer und plasmidärer pAMG21-muOPG-met[22-401]-DNA als Template. Die thermocyclischen Bedingungen waren wie in Abschnitt B beschrieben. Die resultierende PCR-Probe wurde in einem Agarosegel aufgetrennt, und das PCR-Produkt wurde ausgeschnitten, gereinigt, mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und BamHI restriktiert und gereinigt. Das obige, mit NdeI und BamHI verdaute und gereinigte PCR-Produkt wurde unter Anwendung von Standardverfahren direktional zwischen die NdeI- und BamHI-Stellen von pAMG21 insertiert. Die Ligationsmischung wurde verwendet zur Transformation von E. coli-393-Wirtszellen durch Elektroporation nach dem Protokoll der Lieferfirma. Klone wurden selektiert, plasmidäre DNA wurde isoliert, und eine DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die DNA-Sequenz des Gens muOPG-met[22-180] zu bestätigen.

25

Die Expression des rekombinanten Polypeptids muOPG-met[22-180] von transformierten 393-Kulturen mit dem rekombinanten Plasmid pAMG21 nach Induktion wurde unter Anwendung von in Abschnitt C beschriebenen Verfahren ermittelt.

30

Oligo #1309-72

5'-GTT CTC CTC ATA TGG AAA CTC TGC CTC CAA AAT ACC TGC A-3'
(SEQ ID NO: 79)

35

Oligo #1309-73

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT GTT GCA TTT CCT TTC TGA ATT AGC
A-3' (SEQ ID NO: 80)

40

L Murine OPG met[27-180]

45

Eine für ein N-terminales Methionin und die Aminosäuren 27 bis 180 von murinem OPG kodierende DNA-Sequenz wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pAMG21 unter Kontrolle des Promotors luxPR wie folgt eingebracht. Eine PCR wurde durchgeführt unter Verwendung der Oligonukleotide # 1309-74 (siehe Abschnitt I) und # 1309-73 (siehe Abschnitt K) als Primer und von plasmidärer pAMG21-muOPG-met[22-401]-DNA als Template. Die thermocyclischen Bedingungen waren wie in Abschnitt B beschrieben. Die resultierende PCR-Probe wurde in einem Agarosegel aufgetrennt, und das PCR-Produkt wurde ausgeschnitten, gereinigt, mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und BamHI restriktiert und gereinigt. Das obige, mit NdeI und BamHI verdaute und gereinigte PCR-Produkt wurde unter Anwendung von Standardverfahren direktional zwischen die NdeI- und BamHI-Stellen in pAMG21 insertiert. Die Ligationsmischung wurde verwendet zur Transformation von E. coli-393-Wirtszellen durch Elektroporation nach dem Protokoll der Lieferfirma. Klone wurden selektiert, plasmidäre DNA wurde isoliert, und eine DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die DNA-Sequenz des Gens muOPG met[27-180] zu bestätigen.

50

Die Expression des rekombinanten Polypeptids muOPG met[27-180] von Kulturen transformierter 393-Zellen mit dem rekombinanten Plasmid pAMG21 nach Induktion wurde unter Anwendung von in Abschnitt C beschriebenen Verfahren ermittelt.

55

60

65

M. Murine OPG m t[22-189] und met[22-194]

Ein für ein N-terminales Methionin und entweder die Aminosäuren 22 bis 189 oder 22-194 von murinem OPG kodierende DNA-Sequenz wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pAMG21 unter Kontrolle des Promotors luxPR wie folgt eingebracht. Die synthetischen Oligonukleotidpaare # 1337-92 und # 1337-93 (=muOPG-189-Linker) oder # 1333-57 und # 1333-58 (=muOPG-194-Linker) wurden unter Anwendung von in Abschnitt B beschriebenen Verfahren einzeln phosphoryliert, und man ließ sie ein Oligo-Linker-Duplex-Paar ausbilden. Gereinigte plasmidäre DNA von pAMG21-muOPG-met[22-401] wurde mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und BspEI gespalten, und die resultierenden DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. Das 413 bp große B-Fragment wurde mittels Standardverfahren der rekombinanten DNA-Technologie isoliert. Die entweder zwischen den Oligos # 1337-92 und # 1337-93 (muOPG-189-Linker) oder den Oligos # 1333-57 und # 1333-58 (muOPG-194-Linker) gebildeten, kohäsive BspEI- und BamHI-Enden enthaltenden phosphorylierten Oligo-Linker-Duplexe und das obige, aus den mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und BspEI verdaulichen Plasmid pAMG21-muOPG-met[22-401] isolierte 413 bp große B-Fragment wurde unter Anwendung von Standardverfahren direkional zwischen die KpnI- und BamHI-Stellen von pAMG21-muOPG met[22-401] insertiert. Jede Ligationsmischung wurde zur Transformation von E. coli-393-Wirtszellen durch Elektroporation nach dem Protokoll der Lieferfirma eingesetzt. Klone wurden selektiert, plasmidäre DNA wurde isoliert, und eine DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die DNA-Sequenz der Gene muOPG-met[22-189] oder muOPG-met[22-194] zu bestätigen.

Die Expression der rekombinanten Polypeptide muOPG-met[22-189] und muOPG-met[22-194] von mit dem rekombinanten Plasmid pAMG21 transformierten 393-Zellen wurde unter Anwendung von in Abschnitt C beschriebenen Verfahren ermittelt.

25 Oligo #1337-92

5'-CCG GAA ACA GAT AAT GAG-3'
(SEQ ID NO: 81)

30 Oligo #1337-93

5'-GAT CCT CAT TAT CTG TTT-3'
(SEQ ID NO: 82)

40 Oligo #1333-57

5'-CCG GAA ACA GAG AAG CCA CGC AAA AGT AAG-3'
(SEQ ID NO: 83)

45 Oligo #1333-58

5'-GAT CCT TAC TTT TGC GTG GCT TCT CTG TTT-3'
(SEQ ID NO: 84)

50 N. Murine OPG met[27-189] und met[27-194]

Eine für ein N-terminales Methionin und entweder die Aminosäuren 27 bis 189 oder 27-194 von murinem OPG kodierende DNA-Sequenz wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pAMG21 unter Kontrolle des Promotors luxPR wie folgt eingebracht. Phosphorylierte Oligo-Linker, entweder "muOPG-189-Linker" oder "muOPG-194-Linker" (siehe Abschnitt M), enthaltend kohäsive BspEI- und BamHI-Enden, und das aus dem mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und BspEI verdaulichen Plasmid pAMG21-muOPG-met[22-401] isolierte ~413 bp große B-Fragment wurden unter Standardtechniken direkional zwischen die KpnI- und BamHI-Stellen des Plasmids pAMG21-muOPG-met[27-401] eingebracht. Jede Ligationsmischung wurde verwendet zur Transformation von E. coli-393-Wirtszellen durch Elektroporation nach dem Protokoll der Lieferfirma. Klone wurden selektiert, plasmidäre DNA wurde isoliert, und eine DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die DNA-Sequenz der Gene muOPG met[27-189] oder muOPG met[27-194] zu bestätigen.

Die Expression von rekombinantem muOPG met[27-189] und muOPG met[27-194] nach Induktion von 393-Zellen mit den rekombinanten pAMG21-Plasmiden wurde unter Anwendung von in Abschnitt C beschriebenen Verfahren ermittelt.

DE 196 54 610 A1

O. Human OPG met[22-185], met[22-189] met[22-194]

Eine für ein N-terminales Methionin und entweder die Aminosäuren 22 bis 185, 22 bis 189, oder 22 bis 194 des humanen OPG-Polypeptids kodierende DNA-Sequenz wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pAMG21 unter Kontrolle des Promotors luxPR wie folgt eingebracht. Die synthetischen Oligonukleotidpaare # 1331-87 und # 1331-88 (= huOPG-185-Linker), # 1331-89 und # 1331-90 (= huOPG-189-Linker), oder # 1331-91 und # 1331-92 (= huOPG-194-Linker) wurden einzeln phosphoryliert, und man ließ sie unter Anwendung der in Abschnitt B beschriebenen Verfahren ein Oligo-Linker-Duplex-Paar ausbilden. Die gereinigte plasmidäre DNA von pAMG21-huOPG-met[27-401] wurde mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und NdeI restringiert, und die resultierenden DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. Das 407 bp große B-Fragment wurde unter Anwendung von Standardverfahren der rekombinanten DNA-Technologie isoliert. Die phosphorylierten Oligo-Linker-Duplexe, die entweder zwischen den Oligos # 1331-87 und # 1331-88 (huOPG-185-Linker), den Oligos # 1331-89 und # 1331-90 (huOPG-189-Linker), oder den Oligos # 1331-91 und # 1331-92 (huOPG-194-Linker) ausgebildet wurden [jeder Linker enthält kohäsive NdeI- und BamHI-Enden], und das obige, aus dem mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und NdeI verdauten Plasmid pAMG21-huOPG-met[27-401] isolierte B-Fragment mit einer Größe von 407 bp wurden unter Anwendung von Standardverfahren direktional zwischen die KpnI- und BamHI-Stellen des Plasmids pAMG21-huOPG-met[27-401] insertiert. Jede Ligationsmischung wurde verwendet zur Transformation von E. coli-393-Wirtszellen durch Elektroporation nach dem Protokoll der Lieferfirma. Klone wurden selektiert, plasmidäre DNA wurde isoliert, und eine DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die DNA-Sequenz der Gene huOPG-met[22-185], huOPG-met[22-189] oder huOPG-met[22-194] zu bestätigen.

Die Expression von rekombinantem huOPG-met[22-185], huOPG-met[22-189] oder huOPG-met[22-194] in transformierten 393-Zellen mit den rekombinanten pAMG21-Plasmiden nach Induktion wurde unter Anwendung der in Abschnitt C beschriebenen Verfahren ermittelt.

Oligo #1331-87

5'-TAT GTT AAT GAG-3' (SEQ ID NO: 85)

Oligo #1331-88

5'-GAT CCT CAT TAA CA-3' (SEQ ID NO: 86)

Oligo #1331-89

5'-TAT GTT CCG GAA ACA GTT AAG-3' (SEQ ID NO: 87)

Oligo #1331-90

5'-GAT CCT TAA CTG TTT CCG GAA CA-3' (SEQ ID NO: 88)

Oligo #1331-91

5'-TAT GTT CCG GAA ACA GTG AAT CAA CTC AAA AAT AAG-
3' (SEQ ID NO: 89)

Oligo #1331-92

5'-GAT CCT TAT TTT TGA GTT GAT TCA CTG TTT CCG GAA
CA-3' (SEQ ID NO: 90)

P. Human OPG met[27-185] met[27-189] m t[27-194]

Eine für ein N-terminales Methionin und entweder die Aminosäuren 27 bis 185, 27 bis 189 oder 27 bis 194 des humanen OPG-Polypeptids kodierende DNA-Sequenz wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pAMG21 unter Kontrolle des Promotors luxPR wie folgt eingebracht. Die phosphorylierten Oligo-Linker "huOPG-185-Linker", "huOPG-189-Linker" oder "huOPG-194-Linker" (siehe Abschnitt O), die jeweils kohäsive NdeI- und BamHI-Enden enthalten, und das aus dem mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und NdeI verdauten Plasmid pAMG21-huOPG-met[27-401] isolierte B-Fragment mit einer Größe von ~407 bp (siehe Abschnitt O) wurden unter Anwendung von Standardverfahren direktional zwischen die KpnI- und BamHI-Stel-

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

65

len des Plasmids pAMG21-huOPG-met[27-401] (siehe Abschnitt J) inseriert. Jede Ligationsmischung wurde verwendet zur Transformation von E. coli-393-Wirtszellen durch Elektroporation nach dem Protokoll der Lieferfirma. Klone wurden selektiert, plasmidäre DNA wurde gereinigt, und eine DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die DNA-Sequenz der Gene huOPG-met[27-185], huOPG-met[27-189] oder huOPG-met[27-194] zu bestätigen.

Die Expression von rekombinantem huOPG-met[27-185], huOPG-met[27-189] und huOPG-met[27-194] der mit den rekombinanten pAMG21-Plasmiden transformierten 393-Zellen wurde unter Anwendung der in Abschnitt C beschriebenen Verfahren ermittelt.

10 O. Murine OPG met[27-401](P33E G36S, A45P)

Eine für ein N-terminales Methionin und die Aminosäuren 27 bis 48 von humanem OPG, gefolgt von den Aminosäureresten 49 bis 401 von murinem OPG kodierende DNA-Sequenz wurde in den prokaryontischen Expressionsvektor pAMG21 unter Kontrolle des Promotors luxPR wie folgt eingebracht. Gereinigte plasmidäre DNA von pAMG21-huOPG-met[27-401] (siehe Abschnitt J) wurde mit den Restriktionsendonukleasen AatII und KpnI gespalten, und ein aus einem Agarosegel unter Anwendung von Standardverfahren der rekombinanten DNA-Technologie isoliertes ~ 1075 bp großes B-Fragment wurde isoliert. Zusätzlich wurde die plasmidäre pAMG21-muOPG-met[22-401]-DNA (siehe Abschnitt D) mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und BamHI verdaut, und das ~ 1064 bp große B-Fragment wurde wie oben beschrieben isoliert. Das isolierte, ~ 1075 bp große pAMG21-huOPG-met[27-401]-Restriktionsfragment, welches kohäsive AatII- und KpnI-Enden enthält (siehe oben), das ~ 1064 bp große pAMG21-muOPG-met[22-401]-Restriktionsfragment, welches kohäsive KpnI- und BamHI-Enden enthält, und ein ~ 5043 bp großes Restriktionsfragment, welches kohäsive AatII- und BamHI-Enden enthält und mit der Nukleinsäuresequenz von pAMG21 zwischen AatII und BamHI korrespondiert, wurden unter Anwendung von Standardverfahren der rekombinanten DNA-Technologie ligiert. Die Ligationsmischung wurde verwendet zur Transformation von E. coli-393-Wirtszellen durch Elektroporation nach dem Protokoll der Lieferfirma. Klone wurden selektiert, und die Anwesenheit des rekombinanten Inserts in dem Plasmid wurde unter Anwendung von Standardverfahren der DNA-Technologie bestätigt. muOPG-27-401 (P33E, G36S, A45P)-Gen. Die Aminosäureaustausche in muOPG von Prolin-33 zu Glutaminsäure-33, Glycerin-36 zu Serin-36, und Alanin-45 zu Prolin-45 resultieren aus dem Austausch der muOPG-Reste 27 bis 48 durch die huOPG-Reste 27 bis 48.

Die Expression von rekombinantem muOPG-met[27-401] (P33E, G36S, A45P) der transformierten 393-Zellen mit dem rekombinanten Plasmid pAMG21 wurde unter Anwendung der in Abschnitt C beschriebenen Verfahren ermittelt.

35 R. Murine OPG met-lys-(his)₇-ala-ser-(asp)₄-lys[22-401](A45T)

Eine DNA-Sequenz, kodierend für einen N-terminalen His-Tag und eine Enterokinase-Erkennungssequenz, welche lautet (NH₂- zum COOH-Terminus): Met-Lys-His-His-His-His-His-Ala-Ser-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys = HEK), gefolgt von den Aminosäuren 22 bis 401 des murinen OPG-Polypeptids, wurde wie folgt unter Kontrolle des vom lac-Repressor regulierten Promotors Ps4 plaziert. pAMG22-His (siehe Abschnitt A) wurde mit den Restriktionsendonukleasen NheI und BamHI verdaut, und das große Fragment (das A-Fragment) wurde aus einem Agarosegel unter Anwendung von Standardverfahren der rekombinanten DNA-Technologie isoliert. Die Oligonukleotide # 1282-91 und # 1282-92 wurden einzeln phosphoryliert, und man ließ sie unter Anwendung von zuvor beschriebenen Verfahren (siehe Abschnitt B) einen Oligo-Linker-Duplex ausbilden. Der zwischen den Oligos # 1282-91 und # 1282-92 mit kohäsiven NheI- und KpnI-Enden ausgebildete phosphorylierte Linker-Duplex, das mit KpnI und BamHI verdaute und gereinigte beschriebene PCR-Produkt (siehe Abschnitt D), und das A-Fragment des mit NheI und BamHI verdauten Vektors pAMG22-His wurden unter Anwendung von Standardverfahren der rekombinanten DNA-Technologie ligiert. Die Ligationsmischung wurde verwendet zur Transformation von E. coli-GM120-Wirtszellen durch Elektroporation nach dem Protokoll der Lieferfirma. Klone wurden selektiert, plasmidäre DNA wurde isoliert, und eine DNA-Sequenzierung erfolgte, um die DNA-Sequenz des Gens muOPG-HEK[22-401] zu bestätigen. Die DNA-Sequenzierung ergab eine Pseudomutation in der natürlichen Sequenz von muOPG, die im muOPG-Polypeptid zu einem einzelnen Aminosäureaustausch von Alanin-45 zu einem Threonin führte.

Die Expression von rekombinantem muOPG-HEK[22-401](A45T) der GM120-Zellen mit dem rekombinanten Plasmid pAMG21 wurde unter Anwendung von den in Abschnitt C beschriebenen ähnlichen Verfahren mit der Abweichung ermittelt, daß anstelle der Zugabe des synthetischen Autoinduktionsmittels für die Zwecke der Induktion IPTG in einer Endkonzentration von 0,4 mM zugegeben wurde.

60

65

Oligo #1282-91

5'-CTA GCG ACG ACG ACG ACA AAG AAA CTC TGC CTC CAA
 AAT ACC TGC ATT ACG ATC CGG AAA CTG GTC ATC AGC TGC TGT
 GTG ATA AAT GTG CTC CGG GTA C-3' (SEQ ID NO: 91) 5

Oligo #1282-92

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG
 TTT CCG GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT CTT
 TGT CGT CGT CGT CG-3' (SEQ ID NO: 92) 10 15

S. Human OPG met-arg-gly-ser-(his)₆[22-401]

Zur Herstellung eines 175 Basenpaare großen Fragments in Form überlappender, doppelsträngiger DNA wurden 8 Oligonukleotide geschaffen (1338-09 bis 1338-16, unten dargestellt). Die Oligos wurden aneliert, ligiert, und die 5'- und 3'-Oligos wurden zur Herstellung großer Mengen des 175 Basen langen Fragments als PCR-Primer eingesetzt. Die endgültigen PCR-Genprodukte wurden mit den Restriktionsendonukleasen Clal und Kpnl verdaut, um ein Fragment zu ergeben, welches die N-terminalen 28 Kodons von humanem OPG ersetzt. Das mit Clal und Kpnl verdaute PCR-Produkt wurde in das ebenfalls mit Clal und Kpnl geschnittene Plasmid pAMG21-huOPG [27-401] insertiert. Die ligierte DNA wurde verwendet zur Transformation von kompetenten Wirtszellen des E. coli-Stammes 393. Klone wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, das rekombinante Proteinprodukt zu produzieren und die Genfusion mit der korrekten Nukleotidsequenz zu besitzen. Die Bestimmung der Protein-Expressionsraten erfolgte durch Untersuchungen von 50 ml Schüttelflaschen. Das Gesamt-Zellsatz und das sonifizierte Sediment wurden hinsichtlich der Expression des Konstrukts analysiert durch Coomassieblau-gefärbte PAGE-Gele und Western-Analyse mit murinem Anti-OPG-Antikörper. Die Expression von huOPG Met-Arg-Gly-Ser-(His)₆[22-401] führte zur Bildung großer Einschlüsse, und das Protein wurde in der unlöslichen (Sediment-)Fraktion lokalisiert. 20 25 30 35

40

45

50

55

60

65

DE 196 54 610 A1

1338-09

ACA AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GA
(SEQ ID NO: 93)

5

1338-10

TTT GTT TTA ACT AAT TAA AGG AGG AAT AAA ATA TGA GAG GAT CGC ATC AC
(SEQ ID NO: 94)

10

1338-11

CAT CAC CAT CAC GAA ACC TTC CCG CCG AAA TAC CTG CAC TAC GAC GAA GA
(SEQ ID NO: 95)

15

1338-12

AAC CTC CCA CCA GCT GCT GTG CGA CAA ATG CCC GCC GGG TAC CCA AAC A
(SEQ ID NO: 96)

20

1338-13

TGT TTG GGT ACC CGG CGG GCA TTT GT
(SEQ ID NO: 97)

25

1338-14

CGC ACA GCA GCT GGT GGG AGG TTT CTT CGT CGT AGT GCA GGT ATT TCG GC
(SEQ ID NO: 98)

30

1338-15

GGG AAG GTT TCG TGA TGG TGA TGG TGA TGC GAT CCT CTC ATA TTT TAT T
(SEQ ID NO: 99)

35

1338-16

CCT CCT TTA ATT AGT TAA AAC AAA TCT AGT ATC AAA TCG ATT GTG TTT GT
(SEQ ID NO: 100)

40

T. Human OPG met-lys[22-401] und met(lys)[22-401]

45 Um die met-lys- und met-(lys)-Versionen von human OPG[22-401] herzustellen, wurden überlappende Oligonukleotide geschaffen, um die geeignete Anzahl an Lysinresten anzufügen. Die beiden Oligos für jedes Konstrukt wurden so geschaffen, daß sie überlappen, um die Bildung des Endprodukts in zwei PCR-Runden zu erlauben. Das Template für die erste PCR-Reaktion war eine plasmidäre DNA-Präparation, die das humane OPG 22-401-Gen enthielt. Die erste PCR führte zur Addition des (der) Lysinreste(n). Die zweite PCR erfolgte unter Einsatz des Produkts der ersten Runde und führte zu einer Addition einer Sequenz, um wieder die erste Restriktionsstelle, Clal, zu ergeben.

50 Die endgültigen PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsendonukleasen Clal und KpnI verdaut, um ein Fragment zu ergeben, welches die N-terminalen 28 Kodons von huOPG ersetzt. Das mit Clal und KpnI verdaute PCR-Produkt wurde anschließend in das Plasmid pAMG21-huOPG [27-401] ligiert, das ebenfalls mit den beiden Restriktionsendonukleasen verdaut worden war. Die ligierte DNA wurde verwendet zur Transformation von kompetenten Wirtszellen des E. coli-Stammes 393. Die Klone wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Bildung des rekombinanten Proteinprodukts und des Besitzes der Genfusion mit der korrekten Nukleotidsequenz einem Screening zugeführt. Die Bestimmung der Protein-Expressionsraten erfolgte anhand von Untersuchungen mit 50 ml Schüttelflaschen. Das Gesamt-Zellsatz und das sonifizierte Sediment wurden hinsichtlich der Expression des Konstruktks durch Coomassieblau-gefärbte PAGE-Gele und Western-Analyse mit murinem Anti-OPG-Antikörper analysiert. Keines der Konstrukte zeigte ein nachweisbares Ausmaß an Proteinexpression, und Einschlußkörper waren nicht sichtbar. Die DNA-Sequenzen wurden durch DNA-Sequenzierung bestätigt.

55 Oligonukleotid-Primer zur Herstellung von Met-Lys huOPG[22-401]:

65

1338-17

ACA AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GAT TTG TTT TAA CTA ATT
 AAA GGA GGA ATA AAA TG
 (SEQ ID NO: 101)

5

1338-18

CTA ATT AAA GGA GGA ATA AAA TGA AAG AAA CTT TTC CTC CAA
 AAT ATC
 (SEQ ID NO: 102)

10

15

1338-20

TGT TTG GGT ACC CGG CGG ACA TTT ATC ACA C
 (SEQ ID NO: 103)

20

Oligonukleotid-Primer zur Herstellung von Met-(Lys)₃-huOPG[22-401]:

25

Oligonucleotide primers to prepare Met-(Lys)₃-huOPG[22-
 401]:

30

1338-17

ACA AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GAT TTG TTT TAA CTA ATT
 AAA GGA GGA ATA AAA TG
 (SEQ ID NO: 104)

35

1338-19

CTA ATT AAA GGA GGA ATA AAA TGA AAA AAA AAG AAA CTT TTC
 CTC CAA AAT ATC
 (SEQ ID NO: 104)

40

1338-20

TGT TTG GGT ACC CGG CGG ACA TTT ATC ACA C
 (SEQ ID NO: 106)

45

50

U. Human und Murine OPG[22-401]/Fc-Fusionen

Vier OPG-Fc-Fusionen wurden hergestellt, bei denen die Fc-Region von humanem IgG1 mit dem N-Terminus entweder der humanen oder murinen Osteoprotegerin-Aminosäuren 22 bis 401 (bezeichnet mit Fc/OPG [22-401]) oder mit dem C-Terminus (bezeichnet mit OPG[22-401]/Fc) fusioniert wurde. Zur Herstellung der Fc-Fusionen wurde der in Beispiel 7 beschriebene Fusionsvektor pFc-A3 verwendet.

55

Sämtliche Fusionsgene wurden unter Anwendung von Standardverfahren der PCR-Technologie hergestellt. Die Templates für die PCR-Reaktionen waren Plasmidpräparationen, die die Target-Gene enthielten. Überlappende Oligos wurden geschafft, um den C-terminalen Bereich eines Gens mit dem N-terminalen Bereich des anderen Gens zu kombinieren. Dieses Verfahren ermöglicht die Fusion der beiden Gene im korrekten Leserahmen, nachdem die geeigneten PCR-Reaktionen durchgeführt worden sind. Anfänglich wurde ein "Fusions"-Oligo für jedes Gen in eine PCR-Reaktion eingebracht mit einem für den das Target-Gen tragenden Vektor universellen Primer. Das komplementäre "Fusions"-Oligo wurde mit einem universellen Primer zur PCR des anderen Gens verwendet. Am Ende dieser ersten PCR-Reaktion wurden zwei getrennte Produkte erhalten, wobei bei jedem einzelnen Gen die Fusionsstelle vorhanden ist, wodurch eine ausreichende Überlappung geschaffen wird, um die zweite PCR-Runde zur Herbeiführung der erwünschten Fusion zu starten. In der zweiten PCR-Runde wurden die ersten beiden PCR-Produkte zusammen mit universellen Primern kombiniert, und über die überlappenden Regionen wurde die fusionierte DNA-Sequenz vollständiger Länge gebildet.

60

65

DE 196 54 610 A1

Die endgültigen PCR-Genprodukte wurden mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und BamHI verdaut und anschließend in den Vektor pAMG21 ligiert, der ebenfalls mit den beiden Restriktionsendonukleasen verdaut worden war. Die ligierte DNA wurde verwendet zur Transformation von kompetenten Wirtszellen des E. coli-Stammes 393. Die Klone wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Bildung des rekombinanten Proteins und des Besitzes der Genfusion mit der korrekten Nukleotidsequenz einem Screening unterzogen. Die Bestimmung der Protein-Expressionsraten erfolgte durch Untersuchungen von 50 ml Schüttelflaschen. Das Gesamt-Zellsatz, das sonifizierte Sediment, und der Überstand wurden auf Expression der Fusion durch Coomassie-gefärbte PAGE-Gele und Western-Analyse mit murinem Anti-OPG-Antikörper analysiert.

10 Fc/huOPG [22-401]

Die Expression des Fusionspeptids Fc/hu OPG [22-401] wurde auf einem Coomassie-gefärbten PAGE-Gel und einem Western Blot nachgewiesen. Die Zellen weisen sehr große Einschlußkörper auf, und die überwiegende Menge des Produkts befindet sich in der unlöslichen (Sediment-)Fraktion. Zur Herstellung dieser OPG-Fc-Fusion wurden die folgenden Primer verwendet:

1318-48

20 CAG CCC GGG TAA AAT GGA AAC GTT TCC TCC AAA ATA TCT TCA TT
(SEQ ID NO: 107)

1318-49

25 CGT TTC CAT TTT ACC CGG GCT GAG CGA GAG GCT CTT CTG CGT GT
(SEQ ID NO: 108)

30 Fc/muOPG [22-401]

Die Expression des Fusionspeptids wurde auf einem Coomassie-gefärbten Gel und auf einem Western Blot nachgewiesen. Die Zellen weisen sehr große Einschlußkörper auf, und die überwiegende Menge des Produkts befindet sich in der unlöslichen (Sediment-)Fraktion. Zur Herstellung dieser OPG-Fc-Fusion wurden die folgenden Primer eingesetzt:

1318-50

40 CGC TCA GCC CGG GTA AAA TGG AAA CGT TGC CTC CAA AAT ACC TGC
(SEQ ID NO: 109)

1318-51

45 CCA TTT TAC CCG GGC TGA GCG AGA GGC TCT TCT GCG TGT
(SEQ ID NO: 110)

50 muOPG [22-401]/Fc

Die Expression des Fusionspeptids wurde auf einem Coomassie-gefärbten Gel und auf einem Western Blot nachgewiesen. Die Menge an rekombinantem Produkt war geringer als die OPG-Fusionsproteine mit der Fc-Region in der N-terminalen Position. Offensichtliche Einschlußkörper wurden nicht nachgewiesen. Die überwiegende Menge des Produkts befand sich offenbar in der unlöslichen (Sediment-)Fraktion. Zur Herstellung dieser OPG-Fc-Fusion wurden die folgenden Primer eingesetzt:

60

65

DE 196 54 610 A1

1318-54

GAA AAT AAG CTG CTT AGC TGC AGC TGA ACC AAA ATC
(SEQ ID NO: 111)

5

1318-55

CAG CTG CAG CTA AGC AGC TTA TTT TCA CGG ATT G
(SEQ ID NO: 112)

10

huOPG[22-401]/Fc

15

Die Expression des Fusionspeptids wurde auf einem Coomassiegefärbten Gel nicht nachgewiesen, obgleich auf dem Western Blot ein schwaches positives Signal vorhanden war. Offensichtliche Einschlußkörper wurden nicht nachgewiesen. Zur Herstellung dieser OPG-Fc-Fusion wurden die folgenden Primer eingesetzt:

20

1318-52

AAA AAT AAG CTG CTT AGC TGC AGC TGA ACC AAA ATC
(SEQ ID NO: 113)

25

1318-53

CAG CTG CAG CTA AGC AGC TTA TTT TTA CTG ATT GG
(SEQ ID NO: 114)

30

V. Human OPG met[22-401]-Fc-Fusion (P25A)

Dieses Konstrukt kombiniert einen Aminosäureaustausch an Position 25 von Prolin zu Alanin (P25A) mit der huOPG met[22-401]-Fc-Fusion. Das Plasmid wurde mit den Restriktionsendonukleasen ClaI und KpnI verdaut, wodurch die N-terminale 28 Kodons des Gens entfernt werden, und das resultierende kleine (weniger als 200 Basenpaare) Fragment wurde mit einem Gel gereinigt. Dieses, den Austausch von Prolin durch Alanin aufweisende Fragment wurde anschließend in das Plasmid pAMG21-huOPG [22-401]-Fc-Fusion ligiert, das mit den beiden Restriktionsendonukleasen verdaut worden war. Die ligierte DNA wurde verwendet zur Transformation von kompetenten Wirtszellen des E. coli-Stammes 393. Die Klone wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Bildung des rekombinanten Proteinprodukts und des Besitzes der Genfusion mit der korrekten Nukleotidsequenz einem Screening unterzogen. Die Bestimmung der Protein-Expressionsraten erfolgte durch Untersuchungen von 50 ml Schüttelflaschen. Das Gesamt-Zellsatz und das sonifizierte Sediment wurden auf Expression des Konstrukts untersucht durch Coomassie-gefärbte PAGE-Gele und Western-Analyse mit murinem Anti-OPG-Antikörper. Die Expressionsrate des Fusionsproteins wurde auf einem Coomassie-gefärbten PAGE-Gel und auf einem Western Blot nachgewiesen. Das Protein befand sich in der unlöslichen (Sediment-)Fraktion. Die Zellen wiesen große Einschlußkörper auf.

40

45

50

W. Human OPG met[22-401](P25A)

Eine für ein N-terminales Methionin und die Aminosäuren 22 bis 401 von humanem OPG kodierende DNA-Sequenz, wobei das Prolin an Position 25 durch Alanin substituiert ist, unter der Kontrolle des Promotors luxPR in dem prokaryontischen Expressionsvektor pAMG21 wurde wie folgt konstruiert: Die synthetischen Oligos # 1289-84 und # 1289-85 wurden aneliert, um einen Oligo-Linker-Duplex mit kohäsiven XbaI- und KpnI-Enden auszubilden. Der synthetische Linker-Duplex nutzte optimale E. coli-Kodons und kodierte für ein N-terminales Methionin. Der Linker umfaßte ferner eine Spei-Restriktionsstelle, die in der ursprünglichen Sequenz nicht vorhanden war. Der Linker-Duplex wurde unter Anwendung von Standardverfahren direktonal zwischen die XbaI- und KpnI-Stellen in pAMG21-huOPG-22-401 insertiert. Die Ligationsmischung wurde durch Transformation in E. coli-GM221-Wirtszellen eingeführt. Die Klone wurden zuerst hinsichtlich der Bildung des rekombinanten Proteins einem Screening unterzogen. Aus positiven Klonen wurde plasmidäre DNA isoliert, und es wurde eine DNA-Sequenzierung durchgeführt, um die DNA-Sequenz des Gens HuOPG-Met[22-401] (P25A) zu bestätigen. Zur Herstellung des XbaI-KpnI-Linkers wurden die folgenden Oligonukleotide eingesetzt:

55

60

65

DE 196 54 610 A1

Oligo #1289-84

5' - CTA GAA GGA GGA ATA ACA TAT GGA AAC TTT TGC TCC
AAA ATA TCT TCA TTA TGA TGA AGA AAC TAG TCA TCA GCT GCT
GTG TGA TAA ATG TCC GCC GGG TAC - 3' (SEQ ID NO: 115)

Oligo #1289-85

10 5' - CCG GCG GAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC TAG
TTT CTT CAT CAT AAT GAA GAT ATT TTG GAG CAA AAG TTT CCA
15 TAT GTT ATT CCT CCT T-3' (SEQ ID NO: 116)

X. Human OPG met[22-401](P26A) und (P26D)

20 Eine DNA-Sequenz, die für ein N-terminales Methionin und die Aminosäuren 22 bis 401 von humanem OPG kodiert, wobei das Prolin an Position 26 durch Alanin substituiert ist, unter der Kontrolle des Promotors luxPR in dem prokaryontischen Expressionsvektor pAMG21 wurde wie folgt hergestellt: Die synthetischen Oligos # 1289-86 und # 1289-87 wurden aneliert, um einen Oligo-Linker-Duplex mit kohäsiven XbaI- und SpeI-Enden auszubilden. Der synthetische Linker-Duplex nutzte optimale E. coli-Kodons und kodierte für ein N-terminales Methionin. Der Linker-Duplex wurde unter Anwendung von Standardverfahren direktional zwischen die XbaI- und SpeI-Stellen in pAMG21-huOPG [22-401] (P25A) insertiert. Die Ligationsmischung wurde durch Transformation in E. coli-GM221-Wirtszellen eingeführt. Die Klone wurden zuerst hinsichtlich der Produktion des rekombinanten Proteins einem Screening unterzogen. Aus positiven Klonen wurde plasmidäre DNA isoliert, und eine DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die DNA-Sequenz des Gens huOPG-met[22-401] (P26A) zu bestätigen. Bei einem der sequenzierten Klone zeigte sich, daß bei ihm das Prolin an Position 26 anstelle von Alanin durch Asparaginsäure substituiert war, und diese Klon erhielt die Bezeichnung huOPG-met[22-401] (P26D). Zur Herstellung des XbaI-SpeI-Linkers wurden die folgenden Oligonukleotide eingesetzt:

Oligo #1289-86

35 5' - CTA GAA GGA GGA ATA ACA TAT GGA AAC TTT TCC
TGC TAA ATA TCT TCA TTA TGA TGA AGA AA - 3'
40 (SEQ ID NO: 117)

Oligo #1289-87

45 5' - CTA GTT TCT TCA TCA TAA TGA AGA TAT TTA GCA
GGA AAA GTT TCC ATA TGT TAT TCC TCC TT - 3'
50 (SEQ ID NO: 118)

Y. Human OPG met(22-194](P25A)

55 Eine DNA-Sequenz, die für ein N-terminales Methionin und die Aminosäuren 22 bis 194 von humanem OPG kodiert, wobei das Prolin an Position 25 durch Alanin substituiert ist, unter der Kontrolle des Promotors luxPR in dem prokaryontischen Expressionsvektor pAMG21 wurde wie folgt hergestellt: Die Plasmide pAMG21-huOPG[27-194] und pAMG21-huOPG[22-401] (P25A) wurden beide mit den Endonukleasen KpnI und BamHI verdaut. Das 450 bp große Fragment wurde aus pAMG21-huOPG[27-194] isoliert, während das 6,1 kbp große Fragment aus pAMG21-huOPG[22-401] (P25A) isoliert wurde. Diese Fragmente wurden miteinander ligiert und durch Transformation in E. coli-GM221-Wirtszellen eingeführt. Die Klone wurden zuerst hinsichtlich der Produktion des rekombinanten Proteins einem Screening unterzogen. Aus positiven Klonen wurde plasmidäre DNA isoliert, und eine DNA-Sequenzierung wurde durchgeführt, um die DNA-Sequenz des Gens huOPG-Met[22-194] (P25A) zu bestätigen.

65 Beispiel 9

Assoziation von OPG-Monomeren

Gentechnisch veränderte CHO-Zellen, die muOPG [22-401] überexprimieren, wurden zum Erhalt von konditioniertem Medium eingesetzt, um das sekretierte rekombinante OPG unter Verwendung von polyklonalen Anti-OPG-Antikörpern des Kaninchens zu analysieren. Ein Aliquot des konditionierten Mediums wurde 20fach konzentriert und anschließend durch reduzierende und nicht-reduzierende SDS-PAGE analysiert (Fig. 15). Unter reduzierenden Bedingungen migrierte das Protein als ein Polypeptid mit einer relativen Molekulmasse von 50–55 kD, wie man es vorhergesagt hätte, wenn das reife Produkt an einer oder mehrerer seiner N-verknüpften Consensus-Glykosylierungsstellen glykosiliert wäre. Bei der Analyse der selben Proben durch nicht-reduzierende SDS-PAGE migrierte die überwiegende Menge des Proteins überraschenderweise als ein Polypeptid mit ungefähr 100 kD, der doppelten Größe des reduzierten Proteins. Zusätzlich gab es eine kleinere Menge des Polypeptids mit einer relative Molekulmasse von 50–55 kD. Dieses Migrationsmuster der SDS-PAGE stimmte mit der Beobachtung überein, daß das OPG-Produkt durch Oxidation einer oder mehrerer freier Sulfhydrylgruppen Dimere bildet.

Das vorhergesagte reife OPG-Polypeptid enthält 23 Cysteinreste, von denen nach Vorhersage 18 an der Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb der Kette beteiligt sind, die die vier Cystein-reichen Domänen umfassen (Fig. 12A). Die fünf verbleibenden C-terminalen Cysteinreste sind bei der Sekundärstruktur, die auf der Grundlage der Homologie mit anderen Vertretern der TNFR-Familie vorhergesagt werden kann, nicht beteiligt. Insgesamt gibt es eine ungerade Nettoanzahl an Cysteinresten, und es ist formal möglich, daß mindestens ein Rest frei ist, um eine intermolekulare Disulfidbindung zwischen zwei OPG-Monomeren auszubilden.

Um den Verlauf der OPG-Kinetik und -Monomerassoziation aufzuklären, erfolgte eine Pulsmarkierung. muOPG[22-401] exprimierende CHO-Zellen wurden wie oben beschrieben 30 Minuten lang in serumfreiem Medium enthaltend ³⁵S-Methionin und -Cystein metabolisch markiert. Nach dieser Zeitdauer wurde das Medium entfernt und durch vollständiges Medium enthaltend unmarkiertes Methionin und Cystein in Mengen eines ungefähr 2000fachen Überschusses der ursprünglichen Konzentration an radioaktiven Aminosäuren ersetzt. Zu den Zeitpunkten 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden, 6 Stunden und 12 Stunden nach der Zugabe wurden die Kulturen geerntet durch Entfernung des konditionierten Mediums, und Lysate der konditionierten Medien und adhärierende Monolayer wurden präpariert. Die Kulturmedien und die Zellsäfte wurden wie oben beschrieben geklärt und anschließend unter Verwendung von Anti-OPG-Antikörpern wie oben beschrieben immunpräzipitiert. Nach dem Waschen der Immunpräzipitate wurden sie durch Kochen in nicht-reduzierendem SDS-PAGE-Puffer freigesetzt und in zwei gleiche Hälften aufgeteilt. Einer Hälfte wurde das Reduktionsmittel β-Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 5% (Vol/Vol) zugegeben, während die andere Hälfte unter nicht-reduzierenden Bedingungen gehalten wurde. Beide Ansätze von Immunpräzipitaten wurden wie oben beschrieben durch SDS-PAGE analysiert, bevor sie für eine Röntgenaufnahme vorbereitet und dieser zugeführt wurden. Die Ergebnisse sind in Fig. 16 dargestellt. Die durch reduzierende SDS-PAGE analysierten Proben sind in den unteren beiden Abbildungen angegeben. Nach der Synthese wird das OPG-Polypeptid rasch zu einem geringfügig größeren Polypeptid prozessiert, wobei es sich hier wahrscheinlich um eine Modifikation durch N-verknüpfte Glykosylierung handelt. Nach ungefähr 1 bis 2 Stunden nimmt die Menge an OPG in der Zelle dramatisch ab und erscheint gleichzeitig im Kulturerstand. Dies ist offenbar das Ergebnis des mit der Zeit stattfindenden vektorielle Transports von OPG aus der Zelle in das Medium, was mit der Beobachtung übereinstimmt, daß OPG ein natürlicherweise sekretiertes Protein ist. Eine Analyse der selben Immunpräzipitate unter nicht-reduzierenden Bedingungen ergibt die Beziehung zwischen der Bildung von OPG-Dimeren und der Sekretion in das konditionierte Medium (Fig. 16, obere Abbildungen). In den ersten 30 bis 60 Minuten werden die OPG-Monomere in der Zelle prozessiert durch offensichtliche Glykosylierung und anschließende Dimer-Bildung. Im Verlauf der Zeit wird die überwiegende Menge der OPG-Monomere in dimere Formen umgewandelt, die nachfolgend aus der Zelle verschwinden. Etwa 60 Minuten nach der Synthese erscheinen OPG-Dimere im konditionierten Medium und werden über die Zeitdauer des Experiments akkumuliert. Im Anschluß an diese Zeitdauer werden OPG-Dimere gebildet, welche anschließend in das Kulturmedium sezerniert werden. OPG-Monomere sind im Verlauf der Zeit in einer geringen Anzahl innerhalb der Zelle persistent, und kleine Mengen erscheinen auch im Medium. Dies ist offenbar nicht das Ergebnis des Zusammenbrechens von kovalenten OPG-Dimeren, sondern vielmehr der Produktion von substochiometrischen Mengen von Monomeren in der Zelle und der nachfolgenden Sekretion.

Rekombinant produziertes OPG von transfizierten CHO-Zellen liegt offenbar überwiegend in Dimer-Form vor. Um zu ermitteln, ob die Dimerisierung ein natürlicher Vorgang der Synthese von OPG ist, analysierten wir das konditionierte Medium einer Zelllinie, die natürlicherweise OPG exprimiert. Die Zelllinie CTLL-2, eine murine zytotoxische T-Lymphozytenzelllinie (ATCC Zugriffsnr. TIB-214) erwies sich in einem Screening von Gewebe- und Zelllinien-RNA als OPG-mRNA exprimierend. Es zeigte sich, daß das OPG-Transkript dasselbe war wie die klonierte und sequenzierte 2,5–3,0 kb große, in der Niere identifizierte RNA, und daß es für ein sekretiertes Molekül kodiert. Eine Western Blot-Analyse von durch CTLL-2-Zellen konditioniertem Medium zeigt, daß die größte, wenn nicht die gesamte Menge des OPG-Proteins als Dimer sekretiert wird (Fig. 17). Hierdurch wird angezeigt, daß die Dimerisierung und Sekretion von OPG kein Artefakt der Überexpression in einer Zelllinie darstellt, sondern wahrscheinlich die Hauptform des Produkts repräsentiert, wie es von exprimierenden Zellen produziert wird.

Gewebe und Serum von normalen und transgenen Mäusen wurden analysiert, um die Natur des in OPG-transgenen Mäusen exprimierten OPG-Moleküls zu ermitteln. Da die OPG-cDNA der Ratte unter Kontrolle eines Hepatozyten-Kontrollelements exprimiert wurde, wurden Extrakte analysiert, die aus dem Parenchym von Kontroll- und transgenen Mäusen unter nicht-reduzierenden Bedingungen hergestellt worden waren (Fig. 18). Anders als bei Kontroll-Mäusen wurden in Extraktten von transgenen Mäusen OPG-Dimere zusammen mit substochiometrischen Mengen von Monomeren rasch nachgewiesen. Die OPG-Dimere und -Monomere sind offenbar identisch mit dem in gentechnisch hergestellten CHO-Zellen exprimierten rekombinanten murinen Protein.

Dies deutet stark darauf hin, daß OPG-Dimere tatsächlich eine natürliche Form des Genprodukts und wahrscheinlich aktive Schlüsselkomponenten sind. In ähnlicher Weise wurden durch Anwendung einer Western Blot-Analyse Serumproben analysiert, die von Kontroll- und transgenen Mäusen erhalten wurden. Bei den Kontroll-Mäusen migriert die überwiegend Menge der OPG-Protein als Dimer, während kleine Mengen an Monomer ebenfalls nachgewiesen werden. Zusätzlich werden signifikante Mengen eines größeren OPG-verwandten Proteins nachgewiesen, welches mit einer relativen Molekulmasse migriert, die mit der vorhergesagten Größe eines kovalent verknüpften Trimmers übereinstimmt. Demgemäß wird rekombinantes OPG in OPG-transgenen Mäusen überwiegend als dimeres Protein exprimiert, und die dimere Form kann die Grundlage für den Osteopetrosen-Phänotyp von OPG-Mäusen sein. Das rekombinante OPG-Protein kann auch in höhermolekularen "trimeren" Formen existieren.

Um festzustellen, ob die fünf C-terminalen Cysteinreste von OPG eine Rolle bei der Homodimerisierung spielen, erfolgte unter Verwendung des QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene, San Diego, CA) gemäß obiger Darlegung ein Austausch der murinen OPG-Kodons für die Cysteinreste 195 (C195), C202, C277, C319 und C400 durch solche für Serin. Das muOPG-Gen wurde zwischen die NotI- und XbaI-Stellen des Vektors pcDNA 3.1 (+) (Invitrogen, San Diego, CA) subkloniert. Das resultierende Plasmid pcDNA 3.1-muOPG und mutagene Primer wurden in Gegenwart von Desoxynukleotiden mit Pfu-Polymerase behandelt und anschließend wie oben beschrieben in einem Thermocycler amplifiziert. Ein Aliquot der Reaktion wird anschließend zur Transfektion von kompetenten *E. coli* XL1-Blue durch Hitzeschock verwendet, bevor ausplattiert wurde. Die plasmidäre DNA von Transformanten wurde anschließend sequenziert, um Mutationen zu bestätigen.

Die folgenden Primerpaare wurden eingesetzt, um das Kodon des murinen OPG-Gens für den Cysteinrest 195 durch ein solches für Serin zu ersetzen, was zur Produktion eines Proteins muOPG [22-401] C195S führt:

1389-19:

5'-CAC GCA AAA GTC GGG AAT AGA TGT CAC-3'
(SEQ ID NO: 150)

1406-38:

5'-GTG ACA TCT ATT CCC GAC TTT TGC GTG-3'
(SEQ ID NO: 151)

Die folgenden Primerpaare wurden eingesetzt, um das Kodon des murinen OPG-Gens für den Cysteinrest 202 durch ein solches für Serin zu ersetzen, was zur Produktion eines Proteins muOPG [22-401] C202S führt:

1389-21

5'-CAC CCT GTC GGA AGA GGC CTT CTT C-3'
(SEQ ID NO: 152)

1389-22:

5'-GAA GAA GGC CTC TTC CGA CAG GGT G-3' (1389-22)
(SEQ ID NO: 153)

Die folgenden Primerpaare wurden eingesetzt, um das Kodon des murinen OPG-Gens für den Cysteinrest 277 durch ein solches für Serin zu ersetzen, was zur Produktion eines Proteins muOPG [22-401] C277S führt:

1389-23:

5'-TGA CCT CTC GGA AAG CAG CGT GCA-3'
 (SEQ ID NO: 154)

5

1389-24:

5'-TGC ACG CTG CTT TCC GAG AGG TCA-3'
 (SEQ ID NO: 155)

10

Die folgenden Primerpaare wurden eingesetzt, um das Kodon des murinen OPG-Gens für den Cysteinrest 319 durch ein solches für Serin zu ersetzen, was zur Produktion eines Proteins muOPG [22-401]C319S führt:

1389-17:

5'-CCT CGA AAT CGA GCG AGC AGC TCC-3'
 (SEQ ID NO: 156)

20

25

1389-18:

5'-CGA TTT CGA GGT CTT TCT CGT TCT C-3'
 (SEQ ID NO: 157)

30

Die folgenden Primerpaare wurden eingesetzt, um das Kodon des murinen OPG-Gens für den Cysteinrest 400 durch ein solches für Serin zu ersetzen, was zur Produktion eines Proteins muOPG [22-401]C400S führt:

35

1406-72:

5'-CCG TGA AAA TAA GCT CGT TAT AAC TAG GAA TGG-3'
 (SEQ ID NO: 158)

40

1406-75:

5'-CCA TTC CTA GTT ATA ACG AGC TTA TTT TCA CGG-3'
 (SEQ ID NO: 159)

45

50

Jedes resultierende, die geeignete Mutation enthaltende muOPG [22-401]-Plasmid wurde anschließend zur Transfektion von humanen 293-Zellen eingesetzt, und das mutante OPG-Fc-Fusionsprotein wurde wie oben dargelegt aus konditioniertem Medium gereinigt. Die biologische Aktivität eines jeden Proteins wurde durch Anwendung des in Beispiel 11 beschriebenen *in vitro*-Assays zur Osteoklastenbildung analysiert. Das konditionierte Medium einer jeden Transfektante wurde analysiert durch nicht-reduzierende SDS-PAGE und Western Blotting mit Anti-OPG-Antikörpern.

55

Eine Mutation von irgendeinem der fünf C-terminalen Cysteinreste führt zur Produktion von überwiegend (> 90%) monomeren 55 kD OPG-Molekülen. Dies deutet stark darauf hin, daß die C-terminalen Cysteinreste zusammen eine R_{II} bei der OPG-H modimerisierung spielen.

60

C-terminale OPG-Deletionsmutanten wurden hergestellt, um die Region(en) der für die OPG-Homodimerisierung wichtigen C-terminalen Domäne von OPG zu kartieren. Diese OPG-Mutanten wurden hergestellt durch PCR-Amplifikation unter Verwendung von Primern, durch die in die C-terminale Region von murinem OPG unreife Translationsterminationssignale eingeführt werden. Das 5'-Oligo wurde nach dem MuOPG-Startkodon (enthaltend eine HindIII-Restriktionsstelle) geschaffen, und die 3'-Oligonukleotide (enthaltend ein Stopkodon und eine Xhol-Stelle) wurden geschaffen, um die C-terminale Region von muOPG entweder bis zum Threoninrest 200 (CT 200), zum Prolin 212 (CT 212), zur Glutaminsäure 293 (CT-293), oder zum Serin 355 (CT-355) zu verkürzen.

65

DE 196 54 610 A1

Die folgenden Primer wurden zur Herstellung von muOPG [22-200] eingesetzt:

1091-39:

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA
AG-3' (SEQ ID NO: 160)

1391-91:

5'-CCT CTC TCG AGT CAG GTG ACA TCT ATT CCA CAC TTT TGC GTG
GC-3' (1391-91) (SEQ ID NO: 161)

Die folgenden Primer wurden zur Herstellung von mOPG [22-212] eingesetzt:

1091-39:

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA
AG-3' (SEQ ID NO: 162)

1391-90:

5'-CCT CTC TCG AGT CAA GGA ACA GCA AAC CTG AAG AAG
GC-3' (SEQ ID NO: 163)

Die folgenden Primer wurden zur Herstellung von muOPG [22-293] eingesetzt:

1091-39:

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA
AG-3' (SEQ ID NO: 164)

1391-89:

5'-CCT CTC TCG AGT CAC TCT GTG GTG AGG TTC GAG TGG
CC-3' (SEQ ID NO: 165)

Die folgenden Primer wurden zur Herstellung von muOPG [22-355] eingesetzt:

1091-39:

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA
AG-3' (SEQ ID NO: 166)

1391-88:

5'-CCT CTC TCG AGT CAG GAT GTT TTC AAG TGC TTG AGG
GC-3' (SEQ ID NO: 167)

65 Jedes resultierende, die passende Verkürzung aufweisende muOPG-ct-Plasmid wurde zur Transfektion von humanen 293-Zellen verwendet, und das mutante OPG-Fc-Fusionsprotein wurde wie oben beschrieben aus konditioniertem Medium gereinigt. Die biologische Aktivität eines jeden Proteins wurde unter Anwendung des in Beispiel 11 beschriebenen in vitro-Assays zur Osteoklastenbildung analysiert. Die konditionierten Medien

DE 196 54 610 A1

wurden auch durch nicht-reduzierende SDS-PAGE und durch Western Blotting unter Verwendung von Anti-OPG-Antikörpern analysiert.

Eine Verkürzung der C-terminalen Region von OPG bewirkt die Fähigkeit von OPG zur Bildung von Homodimeren. CT 355 ist überwiegend monomer, obgleich einige Dimere gebildet werden. CT 293 bildet offenbar gleiche molare Mengen an Monomer und Dimer sowie ebenfalls höhermolekulare Aggregate. CT 212 und CT 200 sind jedoch monomer. 5

Beispiel 10

Reinigung von OPG

10

A. Reinigung von Säuger-OPG-Fc-Fusionsproteinen

5 l eines von ein OPG-Fc-Fusionsprotein exprimierenden 293-Zellen konditionierten Mediums wurden wie folgt hergestellt. Eine gefrorene Zellprobe wurde in 10 ml 2935-Medium (glucosreiches DMEM, 1 × L-Glutamin, 10% hitzeaktiviertes fetales bovin Serum (FBS) und 100 µg/ml Hygromycin) aufgetaut und nach 1 Tag mit frischem Medium ernährt. Nach 3 Tagen wurden die Zellen in Verdünnungen von 1 : 10 und 1 : 20 auf zwei T175-Flaschen aufgeteilt. Zwei zusätzliche 1 : 10-Aufteilungen erfolgten für die Herstellung von 200 T175-Flaschen. Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen 5 Tage lang aufgetaut. Die Zellen wurden fast bis zur Konfluenz (etwa 3 Tage) kultiviert, und zu diesem Zeitpunkt wurde Serum enthaltendes Medium abgezogen, und die Zellen wurden 1-mal mit 25 ml PBS pro Flasche gewaschen, und jeder Flasche wurden 25 ml SF-Medium (glucose reiches DMEM, 1 × L-Glutamin) zugegeben. Die Zellen wurden 3 Tage lang bei 5% CO₂ gehalten, und das Medium wurde geerntet, zentrifugiert und durch 0,45 µm Cellulosenitratfilter (Corning) filtriert. 15

Die OPG-Fc-Fusionsproteine wurden unter Verwendung einer Protein G-Sepharosesäule (Pharmacia) gereinigt, welche in PBS equilibriert worden war. Die Säulengröße variierte in Abhängigkeit von dem Volumen an Ausgangsmedium. Das wie oben beschrieben präparierte konditionierte Medium wurde auf die Säule geladen, und die Säule wurde mit PBS gewaschen, und reines Protein eluierte unter Verwendung von 100 mM Glycin, pH-Wert 2,7. Die Fraktionen wurden in Röhrchen gesammelt, die 1 M Tris, pH-Wert 9,2, enthielten, um so schnell wie möglich zu neutralisieren. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, in einer Amicon-Centricon 10 oder -Centriprep 10 konzentriert und in PBS diafiltriert. Das reine Protein wird bei -80°C aufbewahrt. 20

Anhand dieses Verfahrens wurden Murine [22-401]-Fc, Murine [22-180]-Fc, Murine [22-194]-Fc, human [22-401]-Fc und human [22-201]-Fc gereinigt. Murine [22-185]-Fc wird anhand dieses Verfahrens aufgereinigt. 25

B. Herstellung von Anti-OPG-Antikörpern

30

Drei Kaninchen des Typs New Zealand White (5–8 Pfd. anfängliches Gewicht) erhielten das muOPG[22-401]-Fc-Fusionsprotein subkutan injiziert. Jedes Kaninchen wurde am Tag 1 immunisiert mit 50 µg Antigen, emulgiert in einem gleichen Volumen an Freund's vollständigem Adjuvans. Weitere Auffrischungen (Tage 14 und 28) erfolgten anhand derselben Vorgehensweise mit Substitution durch Freund's unvollständigem Adjuvans. Die Antikörpertiter wurden durch EIA überwacht. Nach der zweiten Auffrischung ergaben die Antiseren hohe Antikörpertiter, und von jedem Tier wurden 25 ml gebildetes Blut erhalten. Die Seren wurden zuerst über eine Affinitätsäule geleitet, an der murine OPG-Fc immobilisiert worden war. Die Anti-OPG-Antikörper wurden eluiert mit Pierce Gentle Elution Buffer enthaltend 1% Eisessigsäure. Das eluierte Protein wurde anschließend in PBS dialysiert und über eine Fc-Säule geleitet, um jedwede für den Fc-Teil des OPG-Fusionsproteins spezifische Antikörper zu entfernen. Die Durchlauffraktionen, die Anti-OPG-spezifische Antikörper enthielten, wurden in PBS dialysiert. 40

45

C. Reinigung von murine OPG [22-401]

50

Antikörper-Affinitätschromatographie

Affinitäts-gereinigte Anti-OPG-Antikörper wurden in Kopplungspuffer (0,1 M Natriumcarbonat, pH-Wert 8,3, 0,5 M NaCl) diafiltriert und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur mit CNBr-aktivierten Sepharose-Kügelchen (Pharmacia) vermischt. Das Harz wurde anschließend ausgiebig mit Kopplungspuffer gewaschen, bevor unbesetzte Stellen 2 Stunden lang bei Raumtemperatur mit 1 M Ethanolamin (pH-Wert 8,0) blockiert wurden. Das Harz wurde anschließend zuerst bei niedrigem pH-Wert (0,1 M Natriumacetat, pH-Wert 4,0, 0,5 M NaCl) und anschließend bei einem hohen pH-Wert (0,1 M Tris-HCl, pH-Wert 8,0, 0,5 M NaCl) gewaschen. Die letzten Waschen wurden 3mal wiederholt. Das Harz wurde schließlich vor der Packung in die Säule mit PBS equilibriert. Sobald die Packung erfolgt war, wurde das Harz mit PBS gewaschen. Eine Blindeelution erfolgte mit 0,1 M Glycin-HCl, pH-Wert 2,5, gefolgt von einer Reequilibrierung mit PBS. 55

60

Das konzentrierte, von muOPG[22-410] exprimierenden CHO-Zellen konditionierte Medium wurde auf die Säule mit einer geringen Fließgeschwindigkeit aufgetragen. Die Säule wurde mit PBS gewaschen, bis die bei 280 nm gemessene UV-Absorption wieder die Grundlinie erreichte. Das Protein wurde aus der Säule zuerst mit 0,1 M Glycin-HCl (pH-Wert 2,5) eluiert, bevor mit PBS reequilibriert und mit einem zweiten Puffer (0,1 M CAPS, pH-Wert 10,5, 1 M NaCl) eluiert wurde. Die beiden Elutionspools wurden getrennt in PBS diafiltriert und vor dem Einfrieren auf -20°C steril filtriert. 65

Konventionelle Chromatographie

Das von CHO-Zellen konditionierte Medium wurde 23fach in einer 20 spiralförmigen Wundpatrone von Amicon (S10Y10) konzentriert und in 20 mM Tris, pH-Wert 8,0, diafiltriert. Das diafiltriert Medium wurde anschließend auf eine Q-Sepharose HP (Pharmacia)-Säule aufgetragen, welche mit 20 mM Tris, pH-Wert 8,0, equilibriert worden war. Die Säule wurde anschließend gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm die Grundlinie erreichte. Das Protein wurde mit einem 20 Säulenvolumen umfassenden Gradienten von 0–300 mM NaCl in Tris, pH-Wert 8,0, eluiert. Das OPG-Protein wurde durch Anwendung eines Western Blots der Säulenfraktionen nachgewiesen.

Die OPG enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und auf eine Endkonzentration von 300 mM NaCl, 0,2 mM DTT gebracht. Eine NiNTA-Superose (Qiagen)-Säule wurde mit 20 mM Tris, pH-Wert 8,0, 300 mM NaCl, 0,2 mM DTT equilibriert, bevor die vereinigten Fraktionen aufgetragen wurden. Die Säule wurde mit Equilibrierungspuffer gewaschen, bis die Grundabsorption erreicht war. Die Proteine wurden aus der Säule mit einem 0–30 mM Imidazol-Gradienten in Equilibrierungspuffer eluiert. Die verbleibenden Proteine wurden von der Säule mit 1 M Imidazol gewaschen. Wiederum wurde ein Western Blot angewendet, um die OPG enthaltenden Fraktionen nachzuweisen.

Die vereinigten Fraktionen aus der NiNTA-Säule wurden dialysiert in 10 mM Kaliumphosphat, pH-Wert 7,0, 0,2 mM DTT. Der dialysierte Pool wurde anschließend auf eine keramische Hydroxylapatit-Säule (Bio-Rad) aufgetragen, welche mit 10 mM Phosphatpuffer equilibriert worden war. Nach dem Waschen der Säule wurde das Protein mit einem 20 Säulenvolumen umfassenden 10–100 mM Kaliumphosphat-Gradienten eluiert. Hieran schloß sich ein 20 Säulenvolumen umfassender Gradient von 100–400 mM Phosphat an.

OPG wurde mittels Coomassieblau-Färbung der SDS-Polyacrylamidgele und durch Western Blotting nachgewiesen. Die Fraktionen wurden vereinigt und in PBS diafiltriert und bei –80°C eingefroren. Das gereinigte Protein läuft als Monomer und wird in dieser Form nach Diafiltration in PBS verbleiben. Das Monomer ist stabil, wenn es eingefroren oder bei pH-Wert 5 und 4°C aufbewahrt wird. Bei der Lagerung bei 4°C in PBS werden sich nach 1 Woche jedoch Dimere und solche Formen bilden, die offenbar Trimere und Tetramere sind.

D. Reinigung von human OPG mit[22-401] aus E. coli

Die bakterielle Zellpaste wurde unter Verwendung eines Homogenisators mit geringer Scherkraft bei 5°C in 10 mM EDTA in einer Konzentration von 15% (Gew./Vol) suspendiert. Die Zellen wurden anschließend durch zwei Homogenisationen mit jeweils 15 000 psi bei 5°C aufgebrochen. Das resultierende Homogenat wurde 1 Stunde lang bei 5°C mit 5000 × g zentrifugiert. Das Zentrifugalsediment wurde durch Homogenisation mit geringer Scherkraft in einer dem ursprünglichen Homogenisationsvolumen entsprechenden Wassermenge gewaschen und nachfolgend wie zuvor zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde anschließend bei Raumtemperatur für 30 Minuten löslich gemacht auf 15% (Gew./Vol) durch eine Lösung von (Endkonzentration) 6 M Guanidin-HCl, 10 mM Dithiotreitol, 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,5. Diese Lösung wurde 30fach verdünnt in 2 M Harnstoff enthaltend 50 mM CAPS, pH-Wert 10,5, 1 mM reduziertes Glutathion, bevor 72 Stunden lang bei 5°C gerührt wurde. Das OPG wurde aus dieser Lösung bei 25°C gereinigt, indem zunächst der pH-Wert mit Essigsäure auf 4,5 eingestellt und anschließend eine Chromatographie unter Verwendung einer Säule von SP-HP-Sepharoseharz durchgeführt wurde, das mit 25 mM Natriumacetat, pH-Wert 4,5, equilibriert worden war. Die Elution der Säule erfolgte bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,1 Säulenvolumen/Minute mit einem 20 Säulenvolumen umfassenden linearen Natriumchlorid-Gradienten von 50 mM bis 550 mM in dem selben Puffer. Die lediglich die erwünschte OPG-Form enthaltenden Peak-Fraktionen wurden vereinigt und bei 5°C aufbewahrt, oder der Puffer wurde durch Phosphat-gepufferte Saline ausgetauscht, und es erfolgte eine Konzentration durch Ultrafiltration und eine anschließende Aufbewahrung bei 5°C. Dieses Material wurde analysiert mittels Umkehrphasen-HPLC, SDS-PAGE, Limulus Amöbozyten-Lysat-Assay auf Anwesenheit von Endotoxin, und N-terminale Sequenzierung. Zusätzlich können zur Untersuchung der gefalteten Beschaffenheit des Proteins Techniken eingesetzt werden wie Massenspektrometrie, pH/Temperaturstabilitäts-, Fluoreszenz-, Zirkular-dichroismus-, Differentialscanning-Kalorimetrie-, und Protease-Profil-Assays.

Beispiel 11

Biologische Aktivität von rekombinantem OPG

Auf der Grundlage der Histologie und Histomorphometrie wurde die Anzahl an Osteoklasten durch hepatische Überexpression von OPG in transgenen Mäusen offenbar deutlich reduziert, was zu einer deutlichen Zunahme des Knochengewebes führte (siehe Beispiel 4). Um eine tieferen Einblick in potentielle Mechanismen zu erhalten, die diesem in vivo-Effekt zugrundeliegen, sind vielfältige Formen von rekombinantem OPG in einem in vitro-Kulturmöd II zur Osteoklastenbildung untersucht worden (Assay zur Osteoklastenbildung). Dieses Kultursystem wurde ursprünglich von Udagawa ausgearbeitet (Udagawa et al, Endocrinology 125, 1805–1813 (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7260–7264 (1990)) und macht Verwendung von einer Kombination aus Knochenmarkzellen und Zellen von Knochenmark-Stromazelllinien. Eine Beschreibung des für diese Untersuchungen angewendeten modifizierten Kultursystems ist zuvor veröffentlicht worden (Lacey et al, Endocrinology 136, 2367–2376 (1995)). Bei diesem Verfahren werden aus den Femuren und Tibias von Mäusen ausgespülte Knochenmarkzellen über Nacht in Kulturmedium kultiviert (α -MEM mit 10% hitzeaktiviertem fetalem bovinen Serum), ergänzt mit 500 U/ml CSF-1 (Kolonie-stimulierender Faktor 1, auch mit M-CSF bezeichnet), einem für Zellen der Monozyten/Makrophagen-Familienabstammung spezifischer hämatopoeti-

scher Wachstumsfaktor. Im Anschluß an diese Inkubation werden die nicht-adhärierenden Zellen gesammelt, einer Gradientenreinigung zugeführt und anschließend mit Zellen der Knochenmarkzelllinie ST2 kokultiviert (1×10^6 nicht-adhärierende Zellen: 1×10^5 ST2-Zellen/ml Medium). Das Medium wird mit Dexamethason (100 nM) und dem als 1,25-Dihydroxyvitamin D3 bekannten biologisch aktiven Metaboliten von Vitamin D3 angereichert (1,25(OH)₂D₃, 10 nM). Um das Erscheinen von Osteoklasten zu verstärken, wird einigen Kulturen Prostaglandin E2 (250 nM) zugegeben. Die Zeitdauer der Kokultivierung liegt gewöhnlich im Bereich von 8 bis 10 Tagen, und das Medium, bei dem sämtliche Zusatzstoffe frisch zugegeben werden, wird alle 3 bis 4 Tage erneuert. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden die Kulturen auf Anwesenheit von Tartrat-resistenter saurer Phosphatase (TRAP) entweder unter Anwendung einer histochemischen Färbung (Sigma Kit #387A, Sigma, St. Louis, MO) oder durch den TRAP-Lösungsassay untersucht. Das histochemische TRAP-Verfahren erlaubt die phänotypische Identifizierung von Osteoklasten, die viele (≥ 3) Zellkerne aufweisen und ebenfalls TRAP+ sind. Der Lösungsassay beinhaltet die Lyse der Osteoklasten enthaltenden Kulturen in einem 0,1% Triton X-100 enthaltenden Citratpuffer (100 mM, pH-Wert 5,0). Die Aktivität der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase wird anschließend auf der Basis der Umwandlung von p-Nitrophenylphosphat (20 nM) zu p-Nitrophenol in Gegenwart von 80 mM Natriumtartrat gemessen, die während einer 3 bis 5 Minuten langen Inkubation bei RT auftritt. Die Reaktion wird abgebrochen durch Zugabe von NaOH in einer Endkonzentration von 0,5 M. Die optische Dichte bei 405 nm wird gemessen, und die Ergebnisse werden ausgewertet.

Vorhergehende Studien (Udagawa et al., ibid.) unter Anwendung des Assays zur Osteoklastenbildung haben gezeigt, daß diese Zellen Rezeptoren für ¹²⁵I-Calcitonin exprimieren (Autoradiographie) und auf Knochenoberflächen Pits machen können, die in Kombination mit der TRAP-Positivität bestätigen, daß die vielkernigen Zellen einen Osteoklasten-Phänotyp aufweisen. Zusätzliche Befunde zur Stützung des Osteoklasten-Phänotyps der vielkernigen Zellen, die im Osteoklasten-Bildungsassay *in vitro* entstehen, sind, daß die Zellen nach Immunzytochemie α - und β -Integrine und nach *in situ*-Hybridisierung (ISH) den Calcitonin-Rezeptor und die TRAP-mRNA exprimieren.

Die huOPG [22-401]-Fc-Fusion wurde aus dem von CHO-Zellen konditionierten Medium gereinigt und nachfolgend im Osteoklasten-Bildungsassay eingesetzt. Bei 100 ng/ml huOPG [22-401]-Fc war die Osteoklastenbildung praktisch zu 100% inhibiert (Fig. 19A). Die in lysierten Kulturen in den Vertiefungen von Mikrotiterplatten gemessenen TRAP-Werte wurden in Gegenwart von OPG mit einem ID₅₀-Wert von ungefähr 3 ng/ml ebenfalls inhibiert (Fig. 20). Das Ausmaß der TRAP-Aktivität in Lysaten war offenbar mit der relativen, durch TRAP-Zytochemie ermittelten Anzahl an Osteoklasten korreliert (vgl. Fig. 19A–19G und 20). Gereinigtes humanes IgG1 und TNF_βp wurden in diesem Modell ebenfalls untersucht, und es wurde gefunden, daß sie keine hemmenden oder stimulierenden Effekte aufweisen, wodurch angedeutet wird, daß die inhibitorischen Effekte von huOPG [22-401]-Fc auf den OPG-Teil des Fusionsproteins zurückzuführen sind. Zusätzliche Formen der humanen und murinen Moleküle sind untersucht worden, und die kumulativen Daten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabelle 1

Effekte vielfältiger zahlreicher OPG-Formen auf die in vitro-Osteoklastenbildung

	OPG-Konstrukt	Relative Bioaktivität in vitro
5	muOPG [22-401]-Fc	+++
10	muOPG [22-194]-Fc	+++
	muOPG [22-185]-Fc	++
	muOPG [22-180]-Fc	-
	muOPG [22-401]	+++
15	muOPG [22-401] C195	+++
	muOPG [22-401] C202	+
	muOPG [22-401] C277	-
	muOPG [22-401] C319	+
	muOPG [22-401] C400	+
20	muOPG [22-185]	-
	muOPG [22-194]	++
	muOPG [22-200]	++
	muOPG [22-212]	-
25	muOPG [22-293]	+++
	muOPG [22-355]	+++
	huOPG [22-401]-Fc	+++
30	huOPG [22-201]-Fc	+++
	huOPG [22-401]-Fc P26A	+++
	huOPG [22-401]-Fc Y28F	+++
	huOPG [22-401]	+++
	huOPG [27-401]-Fc	++
35	huOPG [29-401]-Fc	++
	huOPG [32-401]-Fc	+/-
40	++, ED ₅₀ = 0,4-2 ng/ml	
	++, ED ₅₀ = 2-10 ng/ml	
	+, ED ₅₀ = 10-100 ng/ml	
	-, ED ₅₀ > 100 ng/ml	
45		
	Die kumulativen Daten legen nahe, daß die murinen und humanen OPG-Aminosäuresequenzen 22-401 in vitro vollständig aktiv sind, wenn sie entweder mit der Fc-Domäne fusioniert sind oder unfusioniert vorliegen. Sie inhibieren in einer dosisabhängigen Weise und besitzen im Bereich von 2-10 ng/ml halbmaximale Aktivitäten. Eine Verkürzung des murinen C-Terminus am Threoninrest 180 führt zur Inaktivierung des Moleküls, wohingegen Verkürzungen am Cystein 185 und darüber hinaus vollständige Aktivität aufweisen. Der an Position 185 lokalisierte Cysteinrest bildet vorhersagegemäß eine SS3-Bindung in der Region der Domäne 4 von OPG. Eine Entfernung dieses Rests in anderen TNFR-verwandten Proteinen ist zuvor als die biologische Aktivität aufhebend beschrieben worden (Yan et al., J. Biol. Chem. 266, 12 099-12 104 (1994)). Unser Befund, daß muOPG [22-180]-Fc inaktiv ist, während muOPG [22-185]-Fc aktiv ist, stimmt mit diesen Befunden überein. Hierdurch wird nahegelegt, daß die Aminosäurereste 22-185 eine Region für die OPG-Aktivität definieren.	
50	Diese Befunde zeigen an, daß das rekombinante OPG-Protein, wie auch transgen exprimierte OPG, die Osteoklastenbildung unterdrückte, wie anhand des Osteoklasten-Bildungsassays festgestellt wurde. Die Experimente hinsichtlich des Zeitverlaufs zur Untersuchung des Erscheinens von TRAP+-Zellen, β3+-Zellen und F480+-Zellen in Kulturen, die kontinuierlich mit OPG exponiert wurden, zeigen, daß OPG das Erscheinen von TRAP+- und β+-Zellen, nicht aber von F480+-Zellen blockiert. Im Gegensatz dazu erscheinen TRAP+- und β3+-Zellen in Kontrollkulturen am 4. Tag nach Kulturbeginn. In mit OPG behandelten Kulturen können lediglich F480+-Zellen gefunden werden, und sie sind offenbar qualitativ in derselben Anzahl wie in den Kontrollkulturen vorhanden. Demgemäß ist bei dem Mechanismus der OPG-Effekte in vitro offenbar eine Blockierung der Osteoklastendifferenzierung nach dem Erscheinen von Monozyten-Makrophagen, aber vor dem Erscheinen von Zellen beteiligt, die entweder TRAP oder β3-Integrine exprimieren. Zusammenfassend zeigen diese Befunde, daß OPG nicht mit dem allgemeinen Wachstum und der Differenzierung von Monozyten/Makrophagen-Vorläufen im Knochenmark interferiert, sondern aus ihnen folgt vielmehr, daß OPG in spezifischer Weise die Differenzierung von Osteoklasten beeinflusst.	
55		
60		
65		

scher Weise die selektive Differenzierung von Osteoklasten aus Monozyten/Makrophagen-Vorläufern blockiert.

Zur genaueren Untersuchung, zu welchem Zeitpunkt OPG die Osteoklastendifferenzierung hemmte, wurde eine Variation des *in vitro*-Kulturverfahrens angewendet. Bei dieser beschriebenen (Lacey et al., ibid.) Variation werden Makrophagen des Knochenmarks als Osteoklastenvorläufer eingesetzt. Die Osteoklastenvorläufer werden abgeleitet durch Entnahme der nach einer Übernacht-Inkubation in CSF-1/M-CSF nicht-adhärierenden Knochenmarkzellen und Kultivieren der Zellen für zusätzliche 4 Tage mit 1000–2000 U/ml CSF-1. Nach einer Kulturdauer von 4 Tagen, die als Wachstumsphase bezeichnet wird, werden die nicht-zusammenhängenden Zellen entfernt. Die adhärierenden Zellen, welche Knochenmark-Makrophagen sind, können anschließend für bis zu 2 Tage vielfältigen Behandlungen in Gegenwart von 1000–2000 U/ml CSF-1 ausgesetzt werden. Diese 5 2-tägige Periode wird intermediäre Differenzierungsperiode genannt. Anschließend werden die Zellschichten wieder abgespült, und dann werden ST-2-Zellen (1×10^5 Zellen/ml), Dexamethason (100 nM) und 1,25(OH)₂D₃ (10 nM) für die letzten 8 Tage zugegeben, was als terminale Differenzierungsperiode bezeichnet wird. 10 Während dieser terminalen Periode können gleichermaßen Testagentien zugegeben werden. Die Aneignung phänotypischer Marker der Osteoklastendifferenzierung erfolgt während dieser terminalen Periode (Lacey et al., ibid.). 15

Im Rahmen dieses Modells wurde huOPG [22-401]-Fc (100 ng/ml) untersucht auf seine Effekte auf die Osteoklastenbildung, indem es entweder während der intermediären, terminalen, oder, alternativ, während beider Differenzierungsperioden zugegeben wurde. Sowohl TRAP-Zytochemie- als auch Lösungs-Assays wurden 20 durchgeführt. Die Ergebnisse des Lösungs-Assays sind in Fig. 21 dargestellt. HuOPG [22-401]-Fc inhibierte das Auftreten der TRAP-Aktivität, wenn es sowohl in der intermediären als auch in der terminalen Phase oder lediglich in der terminalen Differenzierungsphase zugegeben wurde. Im Falle der Zugabe während der intermediären Phase und der anschließenden Entfernung aus den Kulturen durch Abspülen blockierte huOPG [22-401]-Fc nicht das Auftreten der TRAP-Aktivität in Kulturlysaten. Die zytochemischen Ergebnisse verlaufen 25 parallel zu den Daten des Lösungs-Assays. Zusammengenommen zeigen diese Beobachtungen, daß huOPG [22-401]-Fc lediglich während der terminalen Differenzierungsperiode anwesend zu sein braucht, um sämtliche seiner suppressiven Effekte auf die Osteoklastenbildung auszuüben.

B. In vivo-Immunitätsexperimente mit IL1- α und IL1- β

IL1 erhöht die Knochenresorption sowohl systemisch als auch lokal, wenn es über die Calvaria von Mäusen subkutan injiziert wird (Boyce et al., Endocrinology 125, 1142–1150 (1989)). Die systemischen Effekte können anhand des Ausmaßes an Hyperkalzämie und der lokalen Effekte histologisch bewertet werden, indem die relative Stärke des Osteoklasten-vermittelten Ansprechens ermittelt wird. Das Ziel dieser Experimente lag in der Klärung der Frage, ob rekombinantes muOPG [22-401]-Fc die lokalen und/oder systemischen Wirkungen 30 von IL1 modifizieren könnte, wenn es über dieselbe Region der Calvaria wie IL1 subkutan injiziert wird. 35

Experiment mit IL1- β

Männliche Mäuse (ICR-Swiss white) im Alter von 4 Wochen wurden in die folgenden Behandlungsgruppen 40 aufgeteilt (5 Mäuse pro Gruppe): Kontrollgruppe: mit IL1 behandelte Tiere (Mäuse erhielten 1 Injektion/Tag von 2,5 µg IL1- β); mit niedriger Dosis von muOPG [22-401]-Fc behandelte Tiere (Mäuse erhielten 3 Injektionen/Tag von 1 µg muOPG [22-401]-Fc); niedrige Dosis von muOPG [22-401]-Fc und IL1- β ; mit hoher Dosis von 45 muOPG [22-401]-Fc behandelte Tiere (Mäuse erhielten 3 Injektionen/Tag von 10 µg muOPG [22-401]-Fc); hohe Dosis von muOPG [22-401]-Fc und IL1- β . Sämtliche Mäuse erhielten die selbe Gesamtanzahl an Injektionen von entweder aktivem Faktor oder Träger (0,1% bovinen Serumalbumin in Phosphat-gepufferter Saline). Sämtliche 50 Gruppen wurden am Tag nach der letzten Injektion eingeschläfert. Die Gewichte und Blutwerte an ionisiertem Calcium werden vor den ersten Injektionen, 4 Stunden nach der zweiten Injektion und 24 Stunden nach der dritten IL1-Injektion kurz vor dem Einschlafen der Tiere gemessen. Nach dem Einschlafen wurde die Calvaria entfernt und für die Herstellung von Paraffinschnitten vorbereitet.

Experimente mit IL1- α

Männliche Mäuse (ICR-Swiss white) im Alter von 4 Wochen wurden in die folgenden Behandlungsgruppen unterteilt (5 Mäuse pro Gruppe): Kontrollgruppe: mit IL1- α behandelte Tiere (Mäuse erhielten 1 Injektion/Tag von 5 µg IL1- α); mit niedriger Dosis von muOPG [22-401]-Fc behandelte Tiere (Mäuse erhielten 1 Injektion/Tag von 10 µg muOPG [22-401]-Fc); niedrige Dosis von muOPG [22-401]-Fc und IL1- α (Dosierung wie oben); mit hoher Dosis von muOPG [22-401]-Fc behandelte Tiere (Mäuse erhielten 3 Injektionen/Tag von 10 µg muOPG [22-401]-Fc); hohe Dosis von muOPG [22-401]-Fc und IL1- α . Sämtliche Mäuse erhielten dieselbe Anzahl an 55 Injektionen/Tag von entweder aktivem Faktor oder Träger. Sämtliche Gruppen wurden am Tag nach der letzten Injektion eingeschläfert. Die Messung der Blutwerte an ionisiertem Calcium erfolgte vor der ersten Injektion, 4 Stunden nach der zweiten Injektion und 24 Stunden nach der dritten IL1-Injektion kurz bevor die 60 Tiere eingeschläfert wurden. Die Gewichte der Tiere wurden vor der ersten Injektion, 4 Stunden nach der zweiten Injektion und 24 Stunden nach der dritten IL1-Injektion und 24 Stunden nach der dritten IL1-Injektion kurz vor dem Einschlafen der Tiere gemessen. Nach dem Einschlafen wurde die Calvaria entfernt und für die 65 Herstellung von Paraffinschnitten vorbereitet.

Histologische Verfahren

Knochenproben des Schädeldaches wurden in Zinkformalin fixiert, in Armeisensäure entkalkt, durch Ethan 1 entwässert und in Paraffin eingebettet. Schnitte (5 µm dick) durch die Calvaria erfolgten neben der Sutura lambdoideus, und sie wurden entweder mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt oder hinsichtlich der Tartratresistenzen sauren Phosphatase-Aktivität (Sigma Kit # 387A) umgesetzt und mit Hämatoxylin gegengefärbt. Die Bewertung der Knochenresorption in den mit IL1- α behandelten Mäusen erfolgte mittels histomorphometrischer Verfahren unter Anwendung der Osteomessung (Osteometrics, Atlanta, GA), bei der histologische Merkmale durch Verwendung einer an einem Mikroskop angebrachten Kamera auf eine A/D-Umsetzerplatte aufgezeichnet werden. Die Bestimmung der Anzahl an Osteoklasten, der mit Osteoklasten geschichteten Oberflächen, sowie der zerfressenen Oberflächen erfolgte in den Markhöhlen des Schädeldachknochens. Die injizierten und nicht-injizierten Seiten der Calvaria wurden getrennt gemessen.

Ergebnisse

Bei den eingesetzten Dosierungen kam es, insbesondere am zweiten Tag, durch IL1- α und IL1- β zu einer Hyperkalzämie, was vermutlich auf die Induktion einer erhöhten systemischen Knochenresorption zurückzuführen ist. Die hyperkalzämische Reaktion wurde in den mit IL1- β behandelten Mäusen durch muOPG [22-401]-Fc blockiert und verminderte sich in mit IL1- α behandelten Mäusen signifikant, wobei der Effekt am zweiten Tag am offensichtlichsten war (Fig. 22A, 22B).

Eine histologische Analyse der Schädeldächer von mit IL1- α und - β behandelten Mäusen zeigt, daß Behandlungen mit IL1 alleine zu einem deutlichen Anstieg der mit der Knochenresorption im Zusammenhang stehenden Indizes führen, einschließlich: Anzahl an Osteoklasten, mit Osteoklasten besetzte Oberflächen, und zerfressene Oberflächen (Oberflächen, die aufgrund der osteoklastischen Wirkung eine tiefe Aussackung aufweisen) (Fig. 23B, Tabelle 2). Die Zunahmen der Knochenresorption als Antwort auf IL1- α oder IL1- β waren auf den injizierten und nicht-injizierten Seiten der Calvaria ähnlich. Injektionen mit muOPG [22-401]-Fc führten zu einer Verminderung der Knochenresorption sowohl in mit IL1- α und IL1- β behandelten Mäusen als auch in Mäusen, die den Träger allein erhielten, aber diese Abnahme wurde lediglich auf den mit muOPG [22-401]-Fc injizierten Seiten der Calvaria beobachtet.

Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Beobachtungen ist, daß muOPG [22-401]-Fc die Knochenresorption inhibierte, und diese Schlußfolgerung wird gestützt durch die Reduktion der Gesamtzahl von Osteoklasten und des Prozentgehaltes der für eine Knochenresorption zur Verfügung stehenden Knochenoberfläche in der Region der Calvaria nahe den Stellen der Injektion von muOPG [22-401]-Fc. Die Wirkungen von muOPG [22-401]-Fc schienen aufgrund histologischer Untersuchungen lokal am deutlichsten zu sein, aber die Tatsache, daß muOPG [22-401]-Fc auch die durch IL1 induzierte Hyperkalzämie abdämpft, legt nahe, daß muOPG [22-401]-Fc systemisch mehr feine Effekte auf die Knochenresorption ausübt.

40

45

50

55

60

65

Tabelle 2. Effekte von OPC auf Variable der Knochenresorption in Mäusen, denen IL-1 injiziert wurde:

		Osteoklastenoberfläche % Knochenoberfläche (Mittelwert ± S.A.)		Zerfressene Oberfläche % Knochenoberfläche (Mittelwert ± S.A.)		Osteoklastenzahl/mm² Gewebereich Mittelwert ± S.A.)	
Experiment 1		Nicht-injizierte Seite Injizierte Seite		Nicht-injizierte Seite Injizierte Seite		Nicht-injizierte Seite Injizierte Seite	
Kontrolle	12,16 ± 1,44	9,54 ± 2,46	8,07 ± 1,90	9,75 ± 1,16	12,31 ± 1,09	11,09	21,50 ± 10,83
IL-1-1 (2,5ug/ml)	17,18 ± 1,30	16,40 ± 2,16	40,66 ± 1,128	17,53 ± 10,28	11,80 ± 1,18,76	60,89 ± 5,16	
OPC (400ug/ml)	10,12 ± 1,71	5,04 ± 1,66	9,77 ± 4,11	4,19 ± 1,61	12,73 ± 1,11,09	15,24 ± 7,54	
OPC (1,1ug/ml)	18,91 ± 2,46	# 13,26 ± 2,50	44,87 ± 8,67	# 25,91 ± 6,82	69,42 ± 16,29	# 47,11 ± 14,26	
Experiment 2							
Kontrolle	11,56 ± 1,22	11,95 ± 2,97	12,67 ± 5,04	10,01 ± 5,11	51,72 ± 21,93	56,01 ± 10,70	
IL-1-1 (5ug/ml)	26,01 ± 4,84	23,46 ± 5,76	37,51 ± 5,16	41,10 ± 12,53	113,60 ± 18,04	102,70 ± 12,09	
OPC (400ug/ml)	14,40 ± 1,00	# 9,26 ± 2,54	11,55 ± 4,14	# 4,29 ± 3,16	72,28 ± 14,11	# 22,65 ± 16,68	
OPC (1,1ug/ml)	29,58 ± 8,80	# 17,83 ± 1,34	31,66 ± 9,21	# 24,38 ± 8,88	106,10 ± 42,17	# 66,56 ± 15,62	

Unterschied zur nicht-injizierten Seite p < 0,05 (durch gepunkteten T-Test)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

C. Syst mische Effekte von muOPG [22-401]-Fc in wachsenden Mäusen

Männlich BDF1-Mäuse im Alter von 3 bis 4 Wochen mit einem Gewicht im Bereich von 9,2—15,7 g wurden in jeweils 10 Mäuse umfassende Gruppen aufgeteilt. Diese Mäuse erhielten subkutane Injektionen mit Salin oder muOPG [22-401]-Fc 2,5 mg/kg bid für eine Zeitdauer von 14 Tagen (5 mg/kg/Tag). Die Mäuse wurden vor der Behandlung, am Tag 7 und am Tag 14 einer Röntgenaufnahme zugeführt. Die Mäuse wurden 24 Stunden nach der letzten Injektion eingeschläfert. Der rechte Oberschenkel wurde entfernt, in Zinkformalin fixiert, in Ameisensäure entkalkt und in Paraffin eingebettet. Schnitte erfolgten durch die mittlere Region der distalen femoralen Metaphyse und den Femurschaft. Die Knochendichte wurde mittels Histomorphometrie in 6 benachbarten Regionen ermittelt, die sich von der metaphysären Grenze der Wachstumszone durch die primäre und sekundäre Spongiosa bis in die femorale Diaphyse (Schaft) erstrecken. Jede Region betrug 0,5 × 0,5 mm

Unterschiede der Röntgenaufnahmen

Nach einer Behandlungsdauer von 7 Tagen gab es in den OPG-behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen Anzeichen einer Zone mit erhöhter Knochendichte in der mit den Wachstumszonen assoziierten Spongiosa. Die Effekte waren in den distalen, femoralen und den proximalen tibialen Metaphysen besonders deutlich ausgeprägt (Fig. 24A—24B). Banden erhöhter Dichte waren jedoch auch in den Wirbelkörpern, der Ileum-Knochenleiste und der distalen Tibia vorhanden. Nach 14 Tagen hatten sich die Regionen der Opazität weiter in die femoralen und tibialen Knochenschäfte erstreckt, obgleich die Intensität der Radioopazität vermindert war. Zusätzlich gab es hinsichtlich der Länge der Oberschenkel beim Abschluß des Experiments oder hinsichtlich der Veränderung der Länge über die Zeitdauer des Experiments keine Unterschiede, was bedeutet, daß OPG das Knochenwachstum nicht verändert.

Histologische Veränderungen

Die distale femorale Metaphyse zeigt in Regionen mit einem Abstand von 1,1 bis 2,65 mm von der Wachstumszone eine erhöhte Knochendichte (Fig. 25 und 26A bis 26B). Dies ist eine Region, in der es durch Osteoklastenvermittelte Knochenresorption in Mäusen zu einem raschen Knochenschwund kommt. In diesen schnell wachsenden jungen Mäusen stimmt die bei der Behandlung mit OPG in dieser Region beobachtete Knochenzunahme mit einer Hemmung der Knochenresorption überein.

D. Effekte von Osteoprotegerin auf den durch Ovarektomie induzierten Knochenschwund in der Ratte

12 Wochen alte weibliche Fisher-Ratten wurden einer Ovarektomie (OVX) oder einer Scheinoperation zugeführt, und es erfolgten duale Röntgenabsorptiometrie (DEXA)-Messungen der Knochendichte in der distalen femoralen Metaphyse. Nach einer Erholungszeit von 3 Tagen erhielten die Tiere über einen Zeitraum von 14 Tagen täglich folgende Injektionen: 10 scheinoperierte Tiere erhielten Trägerstoff (Phosphat-gepufferte Saline); 10 OVX-Tiere erhielten Trägerstoff (Phosphat-gepufferte Saline); 6 OVX-Tiere erhielten OPG-Fc 5 mg/kg SC; 6 OVX-Tiere erhielten Pamidronat (PAM) 5 mg/kg SC; 6 OVX-Tiere erhielten Östrogen (ESTR) 40 kg/kg SC. Nach einer Behandlungsdauer von 7 und 14 Tagen wurde die Knochendichte der Tiere durch DEXA gemessen. 2 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere eingeschläfert, und die rechte Tibia und der Femur wurden für eine histologische Auswertung entnommen.

Die DEXA-Messungen der Knochendichte zeigten einen Trend zur Reduktion der Knochendichte nach Ovarektomie, welcher durch OPG-Fc blockiert wurde. Seine Effekte waren denjenigen der bekannten Antiresorptionsmittel Östrogen und Pamidronat ähnlich (Fig. 27). Die histomorphometrische Analyse bestätigte diese Beobachtungen und zeigte, daß eine Behandlung mit OPG-Fc in OVX-Ratten zu einer signifikant höheren Knochendichte führt, als sie bei unbehandelten OVX-Ratten festgestellt wurde (Fig. 28). Diese Ergebnisse bestätigen die Aktivität von OPG beim Knochenschwund, der mit einem Entzug von endogenem Östrogen im Anschluß an eine Ovarektomie assoziiert ist.

Zusammenfassung der in vivo-Wirkungen

Die in vivo-Wirkungen von rekombinantem OPG verlaufen parallel zu den Veränderungen, die bei OPG-transgenen Mäusen beobachtet wurden. Die bei den OPG-transgenen Mäusen festgestellte Verminderung der Anzahl an Osteoklasten wird reproduziert durch lokales Injizieren von rekombinantem OPG über die Calvaria von normalen Mäusen und Mäusen, die mit IL1- α oder IL1- β behandelt wurden. Die OPG-transgenen Mäuse entwickeln einen Osteopetrosen-Phänotyp mit progressivem Auffüllen der Markhöhle mit Knochen und nicht-umgeformtem Knorpel, der sich von den Wachstumszonen erstreckt, vom Tag 1 nach der Geburt beginnend. In normalen 3 Wochen alten (wachsenden) Mäusen führen die Behandlungen mit OPG ebenfalls zur Reteification von Knochen und nicht-umgeformtem Knorpel in Regionen intercartilaginärer Knochenbildung, wobei dieser Effekt radiographisch beobachtet und histologisch bestätigt wurde. Demgemäß führt rekombinantes OPG zu phänotypischen Veränderungen von normalen Tieren, die denen ähnlich sind, die bei den transgenen Tieren beobachtet werden, und die Veränderungen stimmen mit der durch OPG induzierten Hemmung der Knochenresorption überein. Auf der Grundlage von in vitro-Assays zur Osteoklastenbildung liegt ein signifikanter Anteil dieser Hemmung an einer beeinträchtigten Osteoklastenbildung. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese blockiert OPG in der Ratte eine durch Ovarektomie induzierte Osteoporose. Der Knochenschwund in diesem Modell wird bekanntermaßen durch aktivierte Osteoklasten vermittelt, was darauf hinweist, daß OPG bei der Behand-

lung von primärer Osteoporose eine Rolle spielt.

Beispiel 12

PEG-Derivate von OPG

5

Herstellung von N-terminalen PEG-OPG-Konjugaten durch reduktive Alkylierung

Der Puffer von HuOPG mit [22-194] P25A wurde durch 25–50 mM NaOAc, pH-Wert 4,5–4,8, ersetzt, und die Konzentration wurde auf 2–5 mg/ml eingestellt. Diese Lösung wurde zur Steuerung einer reduktiven OPG-Alkylierung mit monofunktionellen PEG-Aldehyden bei 5–7°C eingesetzt. Der OPG-Lösung wurden lineare oder verzweigte monofunktionelle PEG-Aldehyde mit einer relativen Molekulmasse von 1 bis 57 kD (erhältlich von Shearwater Polymers) als Feststoffe in Mengen von 2–4 Mol PEG-Aldehyd pro Mol OPG angegeben. Nach Auflösung des Polymers in der Proteinlösung wurde Natriumcyanometallborhydrid einer frisch zubereiteten 1–1,6 M Stammlösung in kaltem entionisierten Wasser zugegeben, um in der Reaktionsmischung eine Endkonzentration von 15 bis 20 mM zu erhalten. Das Voranschreiten der Reaktion und das Ausmaß der Derivatisierung von OPG durch PEG (OPG-PEGylierung) wurde überwacht durch Größenausschluß-HPLC auf einer G3000SWXL-Säule (Toso Haas), eluierend mit 100 mM NaPO₄, 0,5 M NaCl, 10% Ethanol, pH-Wert 6,9. Typischerweise ließ man die Reaktion 16 bis 18 Stunden lang ablaufen, wonach die Reaktionsmischung 6 bis 8fach verdünnt und der pH-Wert auf 3,5–4 abgesenkt wurde. Die Reaktionsmischung wurde fraktioniert durch Ionenaustauschchromatographie (HP SP HiLoad 16/10, Pharmacia), eluierend mit 20 mM NaOAc, pH-Wert 4, mit einem 25 Säulenvolumen umfassenden linearen Gradienten auf 0,75 M NaCl bei einer Fließgeschwindigkeit von 30 cm/Std. Fraktionen von mono-, di- oder poly-PEGyliertem OPG wurden vereinigt und mittels SEC HPLC und SDS-PAGE charakterisiert. Durch N-terminale Sequenzierung wurde nachgewiesen, daß das mono-PEG-OPG-Konjugat als Hauptreaktionsprodukt in den meisten Fällen zu 98% N-terminal PEG-modifiziertes OPG war.

10

15

20

25

Diese Vorgehensweise wurde allgemein angewendet, um die folgenden N-terminalen PEG-OPG-Konjugate herzustellen (wo OPG HuOPG mit [22-194] P25A ist; 5 kD monoPEG, 10 kD mono-verzweigtes PEG, 12 kD monoPEG, 20 kD monoPEG, 20 kD mono-verzweigtes PEG, 25 kD monoPEG, 31 kD monoPEG, 57 kD monoPEG, 12 kD diPEG, 25 kD diPEG, 31 kD diPEG, 57 kD diPEG, 25 kD triPEG).

30

Herstellung von PEG-OPG-Konjugaten durch Acylierung

Der Puffer von HuOPG mit [22-194] P25A wurde ausgetauscht durch 50 mM BICINE-Puffer, pH-Wert 8, und die Konzentration wurde auf 2–3 mg/ml eingestellt. Diese Lösung wurde verwendet, um die Acylierung von OPG mit monofunktionellen PEG N-Hydroxysuccinimidylestern bei Raumtemperatur zu steuern. Der OPG-Lösung wurden lineare oder verzweigte PEG N-Hydroxysuccinimidylester mit einer relativen Molekulmasse von 1 bis 57 kD (erhältlich von Shearwater Polymers) als Feststoffe in Mengen zugegeben, die 4–8 Mol PEG N-Hydroxysuccinimidylester pro Mol OPG entsprechen. Das Voranschreiten der Reaktion und das Ausmaß der Derivatisierung von OPG mit PEG wurde überwacht durch Größenausschluß-HPLC auf einer G3000SWXL-Säule (Toso Haas), eluierend mit 100 mM NaPO₄, 0,5 M NaCl, 10% Ethanol, pH-Wert 6,9. Typischerweise ließ man die Reaktion 1 Stunde lang ablaufen, wonach die Reaktionsmischung 6 bis 8fach verdünnt und der pH-Wert auf 3,5–4 abgesenkt wurde. Die Reaktionsmischung wurde fraktioniert durch Ionenaustauschchromatographie (HP SP HiLoad 16/10, Pharmacia), eluierend mit 20 mM NaOAc, pH-Wert 4, mit einem 25 Säulenvolumen umfassenden linearen Gradienten auf 0,75 M NaCl bei einer Fließgeschwindigkeit von 30 cm/Std. Fraktionen von mono-, di- oder poly-PEGyliertem OPG wurden vereinigt und mittels SEC HPLC und SDS-PAGE charakterisiert.

35

40

45

Diese Vorgehensweise wurde allgemein angewendet, um die folgenden PEG-OPG-Konjugate herzustellen: 5 kD polyPEG, 20 kD polyPEG, 40 kD poly-verzweigtes PEG, 50 kD polyPEG.

50

Herstellung von dimerem PEG-OPG

HuOPG mit [22-194] P25A wird zur Thiolierung bei 1–3 mg/ml in einem Phosphatpuffer mit einem pH-Wert nahe dem neutralen Bereich vorbereitet. S-Acetylthiobornsteinsäureanhydrid (AMSA) wird unter Aufrechterhaltung des pH-Wertes bei 7,0 in einem 3–7-fachen molaren Überschuß zugegeben, und der Reaktionsansatz wird 2 Stunden lang bei 4°C gerührt. Das monothiolierte OPG wird von unmodifiziertem und polythioliertem OPG durch Ionenaustauschchromatographie getrennt, und das geschützte Thiol wird durch Behandlung mit Hydroxylamin entschützt. Nach dem Entschützen wird das Hydroxylamin durch Gelfiltration entfernt, und das resultierende m nothiolierte OPG wird einer Vielzahl v n thioispezifischen chemischen Vernetzungsmitteln zugeführt. Um ein über Disulfidbindungen verknüpftes Dimer zu schaffen, läßt man das thiolierte OPG bei > 1 mg/ml durch Dialyse in schwach basischem Phosphatpuffer eine Luftoxidation durchlaufen. Das kovalente Thioether-OPG-Dimer wurde hergestellt durch Umsetzung des Bis-maleimid-Vernetzungsmittels N,N-Bis(3-maleimidopropiyl)-2-hydroxy-1,3-propan mit dem thiolierten OPG bei > 1 mg/ml bei einem molaren Verhältnis von Vernetzungsmittel 1 zu OPG von 0,6 in Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 6,5. In ähnlicher Weise werden die PEG-Dumbbells hergestellt durch Umsetzung von substöchiometrischen Mengen v n Bis-maleimid-PEG-Vernetzungsmitteln mit thioliertem OPG bei > 1 mg/ml in Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 6,5. Jedes der obigen dimeren Konjugat kann durch Einsatz von Ionenaustausch- oder Größenausschluß-Chromatographie weiter aufgereinigt werden.

55

60

65

Unter Anwendung der obigen Verfahren hergestellte dimere PEG-OPG-Konjugate (bei denen OPG HuOPG met [22-194] P25A ist) schließen Disulfid-verknüpftes OPG-Dimer, kovalentes Thioether-OPG-Dimer mit einem aliphatischen Vernetzungsmittel des Amintyps, 3,4 kD große und 8 kD große PEG-Dumbbells und -M nobells ein.

5 Die PEG-OPG-Konjugate wurden hinsichtlich ihrer in vitro-Aktivität unter Anwendung des in Beispiel 11A beschriebenen Assays zur Osteoklastenreifung, und hinsichtlich ihrer in vivo-Aktivität durch Messung der erhöhten Knochendichte nach Injektion von Mäusen gemäß Darlegung in Beispiel 11C untersucht. Die in vivo-Aktivität ist in der folgenden Tabelle 3 dargestellt.

10

Tabelle 3

Biologische in vivo-Aktivität von PEG-OPG-Konjugaten

	<u>OPG-Konstrukt</u>	<u>Zunahme der tibialen Knochendichte</u>
	muOPG met [22-194]	-
20	muOPG met [22-194] 5k PEG	+
	muOPG met [22-194] 20k PEG	+
25	huOPG met [22-194] P25A	-
	huOPG met [22-194] P25A 5k PEG	+
	huOPG met [22-194] P25A 20k PEG	+
30	huOPG met [22-194] P25A 31k PEG	+
	huOPG met [22-194] P25A 57k PEG	+
	huOPG met [22-194] P25A 12k PEG	+
35	huOPG met [22-194] P25A 20k verzweigtes PEG	+
	huOPG met [22-194] P25A 8k PEG-Dimer	+
	huOPG met [22-194] P25A Disulfid-Vernetzung	+

40 Obgleich die Erfindung in bezug auf ihre derzeit bevorzugten Ausführungsformen beschrieben worden ist, soll sie durch die offensichtlichen Ausführungsformen nicht beschränkt werden, sondern es ist im Gegensatz hierzu beabsichtigt, zahlreiche Modifikationen und Äquivalente abzudecken, die von den Grundgedanken der Erfindung und dem Schutzmfang der anhängenden Ansprüche eingeschlossen werden, deren Schutzbereich in
45 größtmöglicher Interpretationsbreite zu ermitteln ist, um sämtliche derartige Modifikationen und Äquivalente zu umfassen.

50

55

60

65

SEQUENZPROTOKOLL

- (1) ALLGEMEINE ANGABEN:
 (i) ANMELDER: Amgen Inc. 5
 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: OSTEOPROTEGERIN
 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 168
 (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
 (A) NAME: Amgen Inc. 10
 (B) STRAÑE: 1840 Dehavilland Drive
 (C) ORT: Thousand Oaks
 (D) BUNDESSTATT: Kalifornien
 (E) LAND: Vereinigte Staaten
 (F) POSTLEITZAHL: 91320 15
 (v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
 (A) DATENTRÄGER: Diskette
 (B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
 (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 20
 (vi) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:
 (A) ANMELDENUMMER:
 (B) ANMELDETAG:
 (C) KLASSIFIKATION: 25
 (iii) ANGABEN ZUM ANWALT/VERTRETER:
 (A) NAME: Robert B. Winter
 (C) REFERENZ/AKTENNUMMER: A-378-CIP2 30
 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 36 Basenpaare 35
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA 40
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:
 AAAGGAAGGA AAAAAGCGGC CGCTACANNN NNNNNNT 45
 50
 55
 60
 65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 16 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

TCGACCCACG CGTCCG

16

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GGGTGCGCAG GC

12

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TGTAAAACGA CGGCCAGT

18

50

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CAGGAAACAG CTATGACC

18

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CAATTAACCC TCACTAAAGG

20 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GCATTATGAC CCAGAAACCG GAC

23

45

50

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

AGGTAGCGCC CTTCTGCACA TTC

23

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

GACTAGTCCC ACAATGAACA AGTGGCTGTG

30

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

ATAAGAATGC GGCGCTAAA CTATGAAACA GCCCAGTGAC CATTC

45

45

50

55

60

65

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GCCTCTAGAA AGAGCTGGGA C

21 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

CGCCCGTGTTC CATTTATGAG C

21 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

45

ATCAAAGGCA GGGCATACTT CCTG

24

50

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

GTTGCACTCC TGTTTCACGG TCTG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

CAAGACACCT TGAAGGGCCT GATG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

TAACTTTAC AGAAGAGCAT CAGC

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

AGCGCGGCCG CATGAACAAG TGGCTGTGCT GCG

33

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

AGCTCTAGAG AAACAGCCCCA GTGACCATT C

31 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

GTGAAGCTGT GCAAGAACCT GATG

24 35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

ATCAAAGGCA GGGCATACTT CCTG

24

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

5

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

CAGATCCTGA AGCTGCTCAG TTTG

24

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

AGCGCGGCCG CGGGGACCAAC AATGAACAAG TTG

33

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

AGCTCTAGAA TTGTGAGGAA ACAGCTCAAT GGC

33

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:	
ATAGCGGCCG CTGAGCCAA ATCTTGTGAC AAAACTCAC	39
	5
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 45 Basenpaare	
(B) ART: Nukleinsäure	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	10
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA	
	15
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:	
TCTAGAGTCG ACTTATCATT TACCCGGAGA CAGGGAGAGG CTCTT	45
	20
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 38 Basenpaare	
(B) ART: Nukleinsäure	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	25
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA	
	30
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:	
CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG	38 35
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 43 Basenpaare	
(B) ART: Nukleinsäure	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	40
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA	
	45
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:	
CCTCTGCGGC CGCTAACGAG CTTATTTCA CGGATTGAAC CTG	43 50
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 38 Basenpaare	
(B) ART: Nukleinsäure	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	55
(D) TOPOLOGIE: linear	
	60

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

5 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG

38

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

TCCGTAAGAA ACAGCCCAGT GACC

24

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

30 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

35 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

CCTCTGCGGC CGCTGTTGCA TTTCCTTCT G

31

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

50 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

55 Glu Thr Leu Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Pro Glu Thr Gly His
1 5 10 15

Gln Leu Leu

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

TCCCCTTGCCCC TGACCACTCT T

21

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

CCTCTGCCGGC CGCACACACAG TTGTATGTG TTGC

34 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

TCCCCTTGCCCC TGACCACTCT T

45

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

50

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

CCTCTGCGGGC CGCCCTTTGC GTGGCTTCTC TGTT

34

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

CCTCTGAGCT CAAGCTTGGT TTCCGGGGAC CACAATG

37

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:

35

CCTCTGCGGGC CGCTAACGAG CTTATTCTTA CTGAATGG

38

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:

50

CCTCTGAGCT CAAGCTTGGT TTCCGGGGAC CACAATG

37

55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

60

65

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39: 5
CCTCTGCGGC CGCCAGGGTA ACATCTATT CAC 33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40: 10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear 15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40: 20
CCGAAGCTTC CACCATGAAC AAGTGGCTGT GCTGC 35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41: 25

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang 30
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41: 35
CCTCTGTCGA CTATTATAAG CAGCTTATTT TCACGGATTG 40 40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42: 50

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang 45
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42: 55
TCCCTTGCCC TGACCACTCT T 21 55

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:

CCTCTGTCGA CTTAACACAC GTTGTCAATGT GTTGC

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:

TCCCTTGCCC TGACCACTCT T

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:

CCTCTGTCGA CTTACTTTG CGTGGCTTCT CTGTT

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 46:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1537 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 46:

GTGAAGAGCG	TGAAGAGCGG	TTCCTCCTT	CAGCAAAAAA	CCCCTCAAGA	CCCGTTAGA	60	
GGCCCCAAGG	GGTTATGCTA	GTTATTGCTC	AGCGGTGGCA	GCAGCCAAC	CAGCTTCCTT	120	5
TCGGGCTTC	TTCTTCTTCT	TCTTCTTCC	GC GGATCCTC	GAGTAAGCTT	CCATGGTACC	180	
CTGCAGGTCTG	ACACTAGTGA	GCTCGAATT	CAACGCGTTA	ACCATATGTT	ATTCTCCTT	240	
TAATTAGTTA	AAACAAATCT	AGAATCAAAT	CGATTAATCG	ACTATAACAA	ACCATTTCT	300	10
TGCGTAAACC	TGTACGATCC	TACAGGTACT	TATGTTAAC	AATTGTATTT	CAAGCGATAT	360	
AATAGTGTGA	CAAAAATCCA	ATTATTAGA	ATCAAATGTC	AATCTATTAC	CGTTTTAATG	420	
ATATATAACA	CGCAAAACTT	GCGACAAACA	ATAGGTAAGG	ATAAAGAGAT	GGGTATGAAA	480	15
GACATAAAATG	CCGACGACAC	TTACAGAATA	ATTAATAAAA	TTAAACCCCTG	TAGAAGCAAT	540	
AATGATATTA	ATCAAATGCTT	ATCTGATATG	ACTAAAATGG	TACATTGTGA	ATATTATTTA	600	20
CTCGCGATCA	TTTATCCTCA	TTCTATGGTT	AAATCTGATA	TTTCAATTCT	GGATAATTAC	660	
CCTAAAAAAT	GGAGGCAATA	TTATGATGAC	GCTAATTAA	AAAAATATGA	TCCTATAGTA	720	
GATTATTCTA	ACTCCAATCA	TTCACCGATT	AATTGGAATA	TATTTGAAAAA	CAATGCTGTA	780	25
AATAAAAAAAT	CTCCAAATGT	AATTAAAGAA	GCGAAATCAT	CAGGTCTTAT	CACTGGGTTT	840	
AGTTTCCCTA	TTCATACTGC	TAATAATGGC	TTCGGAATGC	TTAGTTTG	ACATTCAAGAG	900	
AAAGACAACT	ATATAGATAG	TTTATTTA	CATGCGTGT	TGAACATACC	ATTAATTGTT	960	30
CCTTCTCTAG	TTGATAATT	TCGAAAAATA	AATATAGCAA	ATAATAAATC	AAACAACGAT	1020	
TTAACCAAAA	GAGAAAAAGA	ATGTTAGCG	TGGGCATGCG	AAGGAAAAAG	CTCTGGGAT	1080	35
ATTTCAAAAA	TATTAGGCTG	TAGTAAGCG	ACGGTCAC	TCCATTAAAC	CAATGCGCAA	1140	
ATGAAACTCA	ATACAACAAA	CCGCTGCCAA	AGTATTCTA	AAGCAATT	AACAGGAGCA	1200	
ATTGATTGCC	CATACTTAA	AAGTTAAGTA	CGACGTCCAT	ATTTGAATGT	ATTTAGAAAA	1260	40
ATAAACAAAA	GAGTTGTAG	AAACGAAAAA	AGGCCATCCG	TCAGGATGGC	CTTCTGCTTA	1320	
ATTTGATGCC	TGGCAGTTA	TGGCGGGCGT	CCTGCCGCC	ACCCTCCGGG	CCGTTGCTTC	1380	
GCAACGTTCA	AATCCGCTCC	CGGCGGATT	GTCCTACTCA	GGAGAGCGTT	CACCGACAAA	1440	45
CAACAGATAA	AACGAAAGGC	CCAGTCTTC	GACTGAGCCT	TTCGTTTAT	TTGATGCCTG	1500	
GCAGTTCCCT	ACTCTCGCAT	GGGGAGACCA	TGCATAC			1537	50

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 47:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 47:

CCGGCGGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GAGAAGTTTC TTCACTCCA

48

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 48:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 55 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 48:

CGATTTGATT CTAGAACCGAG GAATAACATA TGTTAACGCC GTTGAATTG GGTAC

55

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 49:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 49 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 49:

CGAATTCCAA CGCGTTAACCC ATATGTATT CCTCCTTCTA GAATCAAAT

49

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 50:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1546 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 50:

GCGTAACGTA TGCATGGTCT	CCCCATGCCA GAGTAGGGAA CTGCCAGGCA	TCAAATAAAA	60
CGAAAGGCTC AGTCGAAAGA	CTGGGCCTTT CGTTTATCT GTTGTGTC	GGTGAACGCT	120 5
CTCCTGACTA GGACAAATCC	GCCGGGAGCG GATTGAAACG TTGCGAAGCA	ACGGCCCGGA	180
GGGTGGCGGG CAGGACGCC	GCCATAAAACT GCCAGGCATC	AAATTAAGCA GAAGGCCATC	240
CTGACGGATG GCCTTTTGC	GTTTCTACAA ACTCTTTGT TTATTTTCT	AAATACATTC	300 10
AAATATGGAC GTCGTACTTA	ACTTTAAAG TATGGCAAT CAATTGCTCC	TGTTAAAATT	360
GCTTAGAAA TACTTGGCA	GCGGTTGTT GTATTGAGTT TCATTGCGC	ATTGGTTAAA	420 15
TGGAAAGTGA CCGTGCGCTT	ACTACAGCCT AATATTTTG	AAATATCCCA AGAGCTTTT	480
CCTTCGCATG CCCACGCTAA	ACATTCTTT TCTCTTTGG	TTAAATCGTT GTTGATTIA	540
TTATTTGCTA TATTTATTT	TCGATAATTA TCAACTAGAG	AAGGAACAAT TAATGGTATG	600 20
TTCATAACAG CATGAAAAAA	AAAACATCT ATATAGTTGT	CTTCTCTGA ATGTGCAAAA	660
CTAACGATT CGAACGCCATT	ATTAGCAGTA TGAATAGGGA	AACTAAACCC AGTGATAAGA	720
CCTGATGATT TCGCTCTTT	AATTACATTG GGAGATTTT	TATTCACAGC ATTGTTTCA	780 25
AATATATTCC AATTAATCGG	TGAATGATTG GAGTTAGAAT	AATCTACTAT AGGATCATAT	840
TTTATTAAAT TAGCGTCATC	ATAATATTGC CTCCATTTT	TAGGGTAATT ATCCAGAATT	900 30
GAAATATCAG ATTAACCAT	AGAATGAGGA TAAATGATCG	CGAGTAAATA ATATTCAAA	960
TGTACCATTT TAGTCATATC	AGATAAGCAT TGATTAATAT	CATTATTGCT TCTACAGGCT	1020
TTAATTTAT TAATTATTCT	GTAAGTGTG	TCGGCATTIA TGCTTTCAT ACCCATCTCT	1080 35
TTATCCTTAC CTATTGTTG	TCGCAAGTTT	TGCGTGTTAT ATATCATTAA AACGGTAATA	1140
GATTGACATT TGATTCTAAT	AAATTGGATT	TTTGTACACAC TATTATATCG CTTGAAATAC	1200
AATTGTTAA CATAAGTACC	TGTAGGATCG	TACAGGTTA CGCAAGAAAA TGGTTGTTA	1260 40
TAGTCGATTA ATCGATTG	TTCTAGATT	GTGTTAACTA ATTAAAGGAG GAATAACATA	1320
TGGTTAACGC GTTGGAAATT	GAGCTCACTA	GTGTCGACCT GCAGGGTACC ATGGAAGCTT	1380 45
ACTCGAGGAT CCGCGGAAAG	AAGAAGAAGA	AGAAGAAAGC CCGAAAGGAA GCTGAGTTGG	1440
CTGCTGCCAC CGCTGAGCAA	TAACTAGCAT	AACCCCTTGG GGCCTCTAAA CGGGTCTTGA	1500
GGGGTTTTT GCTGAAAGGA	GGAACCGCTC	TTCACGCTCT TCACGC	1546 50

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 51:

(i) SEQUENZKENNZETCHEN:

- (A) LÄNGE: 47 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 51:

TATGAAACAT CATCACCATC ACCATCATGC TAGCGTTAAC GCGTTGG

47

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 52:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 49 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 52:

AATTCCAACG CGTTAACGCT AGCATGATGG TGATGGTGAT GATTTCA

49

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 53:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 141 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 53:

CTAATTCCGC TCTCACCTAC CAAACAATGC CCCCTGCAA AAAATAAATT CATATAAAAA

60

ACATACAGAT AACCATCTGC GGTGATAAAAT TATCTCTGGC GGTGTTGACA TAAATACCAC

120

50

TGGCGGTGAT ACTGAGCACA T

141

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 54:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 147 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 54:

CGATGTGCTC AGTATCACCG CCAGTGGTAT TTATGTCAAC ACCGCCAGAG ATAATTATC
ACCGCAGATG GTTATCTGTA TGTTTTTAT ATGAATTTAT TTTTGCAGG GGGGCATTGT
TTGGTAGGTG AGAGCGGAAT TAGACGT

60

15

120

147

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 55:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 55 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 55:

CGATTTGATT CTAGAAGGAG GAATAACATA TGTTAACGC GTTGGAAATTC GGTAC

55

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 56:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 49 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 56:

CGAATTCCAA CGCGTTAACCT ATATGTATT CCTCCTTCTA GAATCAAAT

49

50

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 57:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 668 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 57:

GTGAAGAGCG	TGAAAGAGCGG	TTCCCTCCTT	CAGCAAAAAA	CCCCTCAAGA	CCCGTTAGA	60
GGCCCCAAGG	GGTTATGCTA	GTTATTGCTC	ACCGGTGGCA	GCAGCCAACT	CAGCTTCCTT	120
TCGGGCTTTC	TTCTTCTTCT	TCTTCTTCC	GCGGATCCTC	GAGTAAGCTT	CCATGGTACC	180
CTGCAGGTCTG	ACACTAGTGA	GCTCGAATT	CAACCGCTTA	ACCATATGTT	ATTCCCTCCTT	240
TAATTAGTTA	ACTCAAATCT	AGAATCAAAT	CGATAAAATTG	TGAGCGCTCA	CAATTGAGAA	300
TATTAATCAA	GAATTTAGC	ATTTGTCAAA	TGAATTTTT	AAAAAATTATG	AGACGTCCAT	360
ATTTGAATGT	ATTTAGAAAA	ATAAACAAAA	GAGTTTGTAG	AAACGCCAAA	AGGCCATCCG	420
TCAGGATGGC	CTTCTGCTTA	ATTTGATGCC	TGGCAGTTA	TGGCGGGCGT	CCTGCCGCC	480
ACCCCTCCGGG	CCGTTGCTTC	GCAACGTTCA	AATCCGCTCC	CGGCGGATTT	GTCCTACTCA	540
GGAGAGCGTT	CACCGACAAA	CAACAGATAA	AACGAAAGGC	CCAGTCTTTC	GACTGAGCCT	600
TTCGTTTAT	TTGATGCCTG	GCAGTTCCCT	ACTCTCGCAT	GGGGAGACCA	TGCATACGTT	660
ACGGCACGT						668

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 58:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 726 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 58:

GCGTAACGTA	TGCATGGTCT	CCCCATGCGA	GAGTAGGGAA	CTGCCAGGCA	TCAAATAAAA	60
CGAAAGGCTC	AGTCGAAAGA	CTGGGCCCTT	CGTTTTATCT	GTTGTTTGTG	GGTGAACGCT	120
CTCCTGAGTA	GGACAAATCC	GCCGGGAGCG	GATTTGAACG	TTGCGAAGCA	ACGGCCCGGA	180
GGGTGGCGGG	CAGGACGCC	GCCATAAACT	GCCAGGCATC	AAATTAAGCA	GAAGGGCCT	240
CCCACCGCCC	GTCCTGCGGG	CGGTATTG	CGGTCCGTAG	TTTAATTG	CTTCGCCATC	300
CTGACGGATG	GCCTTTTGC	GTTTCTACAA	ACTCTTTGT	TTATTTTCT	AAATACATTC	360

DE 196 54 610 A1

AAATATGGAC GTCTCATAAT TTTTAAAAAA TTCATTGAC AAATGCTAAA ATTCTTGATT	420
AATATTCTCA ATTGTGAGCG CTCACAATTG ATCGATTGA TTCTAGATTG TTTTTAACTA	480
ATTAAAGGAG GAATAACATA TGGTTAACGC GTTGGAAATTG GAGCTCACTA GTGTCGACCT	540
GCAGGGTACC ATGGAAGCTT ACTCGAGGAT CCCCGGAAAG AAGAAGAAGA AGAAGAAAGC	600
CCGAAAGGAA GCTGAGTTGG CTGCTGCCAC CGCTGAGCAA TAACTAGCAT AACCCCTTGG	660
GGCCTCTAAA CGGGTCTTGA GGGGTTTTT GCTGAAAGGA GGAACCGCTC TTCACGCTCT	720
TCACGC	726

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 59: 15

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 44 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA 25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 59:

TACGCACTGG ATCCTTATAA GCAGCTTATT TTTACTGATT GGAC 44

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 60:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA 40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 60:

GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAAC 27

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 61:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 102 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA 55

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 61:

TATGGATGAA GAAACTTCTC ATCAGCTGCT GTGTGATAAA TGTCCGCCGG GTACCCGGCG 60
5 GACATTTATC ACACAGCAGC TGATGAGAAG TTTCTTCATC CA 102

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 62:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 62:

20 Met Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro
1 5 10 15

Gly Thr Tyr

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 63:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 84 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 63:

40 TATGGAAACT TTTCTCTCAA AATATCTTCA TTATGATGAA GAAACTTCTC ATCAGCTGCT 60
GTGTGATAAA TGTCCGCCGG GTAC 84

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 64:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 78 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

55 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 64:

60 CGGGCGGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GAGAAGTTTC TTCATCATAA TGAAGATATT 60
TTGGAGGAAA AGTTTCCA 78

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 65:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 44 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

5

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 65:

TACGCAC TGG ATCC TTATAA GCAG CT TATT TTCAC GGG ATT GAAC

44

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 66:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 66:

GTGCT CCTGG TACCTACCTA AAAC ACCACT GCAC AGTG

38

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 67:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 84 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 67:

TATGGAAACT CTGCCTCCAA AATA CCTGCA TTACGATCCG GAAACTGGTC ATCAGCTGCT

45

60

GTGTGATAAA TGTGCTCCGG GTAC

84

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 68:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 78 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 68:

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC CGGATCGTAA TGCAGGTATT 60
5 TTGGAGGCAG AGTTTCCA 78

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 69:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 10 (A) LÄNGE: 54 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 69:

25 TATGGACCCA GAAACTGGTC ATCAGCTGCT GTGTGATAAA TGTGCTCCGG GTAC 54

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 70:

25 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

30 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

35 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 70:

40 CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC TGGGTCCA 48

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 71:

45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 87 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

55 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 71:

TATGAAAGAA ACTCTGCCTC CAAAATACCT GCATTACGAT CCGGAAACTG GTCATCAGCT 60
55 GCTGTGTGAT AAATGTGCTC CGGGTAC 87

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 72:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 81 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 72:

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC CGGATCGTAA TGCAGGTATT

60

15

TTGGAGGCAG AGTTTCTTTC A

81

81

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 73:

20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 73:

GTTCTCCTCA TATGAAACAT CATCACCATC ACCATCATGA AACTCTGCCT CCAAAATACC

60

TGGCATTACGA T

71

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 74:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 74:

GTTCTCCTCA TATGAAAGAA ACTCTGCCTC CAAAATACCT GCA

43 50

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 75:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 76 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 75:

TACGGCACTGG ATCCTTAATG ATGGTGATGG TGATGATGTA AGCAGCTTAT TTTCACGGAT 60
15 TGAACCTGAT TCCCTA 76

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 76:

20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 47 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 76:

GTTCTCCTCA TATGAAATACTGCATTACG ATCCGGAAAC TGGTCAT 47

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 77:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 77:

GTTCTCCTAT TAATGAAATA TCTTCATTAT GATGAAGAAA CTT 43

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 78:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 78:
TACGCACTGG ATCCTTATAA GCAGCTTATT TTTACTGATT 40
5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 79:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 40 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang 10
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA 15
15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 79:
GTTCTCCCTCA TATGGAAACT CTGCCTCCAA AATACCTGCA 40
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 80:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 43 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang 25
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA 30
30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 80:
TACGCACTGG ATCCTTATGT TGCATTCCT TTCTGAATTA GCA 43 35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 81:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang 40
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA 45
45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 81:
CCGGAAACAG ATAATGAG 50
18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 82:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang 55
(D) TOPOLOGIE: lin ar 60
60

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

5 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 82:

GATCCTCATT ATCTGTTT

18

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 83:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 83:

CCGGAAACAG AGAACGCCAGG CAAAAGTAAG

30

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 84:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

50 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 84:

40 GATCCTTACT TTTGGGTGGC TTCTCTGTTT

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 85:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

55 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 85:

TATGTTAACG AG

12

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 86:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 86:

GATCCTCATT AACA

14 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 87:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 87:

TATGTTCCGG AAACAGTTAA G

21

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 88:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 88:

GATCCTTAAC TGTTTCCGG ACA

23 50

55

60

65

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 89:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 89:

TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATAAG

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 90:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 90:

GATCCTTATT TTTGAGTTGA TTCACTGTTT CCGGAACA

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 91:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 100 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 91:

CTAGCGACGA CGACGACAAA GAAACTCTGC CTCCAAAATA CCTGCATTAC GATCCGGAAA

60

CTGGTCATCA GCTGCTGTGT GATAATGTG CTCCGGGTAC

100

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 92:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 92 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 92:

15

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC CGGATCGTAA TGCAGGTATT

60

TTGGAGGCAG AGTTCTTG TCGTCGTCGT CG

92

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 93:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 93:

35

ACAAACACAA TCGATTTGAT ACTAGA

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 94:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

40

- (A) LÄNGE: 50 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 94:

TTTGTAACTAATTAAG GAGGAATAAA ATATGAGAGG ATCGCATCAC

50

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 95:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 50 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 95:

CATCACCATC ACGAACCTT CCCGCCAAA TACCTGCACT ACGACGAAGA

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 96:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 49 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 96:

AACCTCCCAC CAGCTGCTGT GCGACAAATG CCCGCCGGGT ACCCAAACA

49

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 97:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 97:

TGTTTGGGTA CCCGGCGGGC ATTTGT

26

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 98:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 50 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 98:

15

CGCACAGCAG CTGGTGGGAG GTTTCTTCGT CGTAGTGCAG GTATTCGGC

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 99:

20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 49 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 99:

GGGAAGGTTT CGTGATGGTG ATGGTGATGC GATCCTCTCA TATTTTATT

49

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 100:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 50 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 100:

50

CCTCCTTTAA TTAGTTAAA CAAATCTAGT ATCAAATCGA TTGTGTTGT

50

55

60

65

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 101:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 101:

15 ACAAAACACAA TCGATTTGAT ACTAGATTTG TTTTAACCTAA TTAAAGGAGG AATAAAATG

59

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 102:

20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 102:

35 CTAATTAAAG GAGGAATAAA ATGAAAGAAA CTTTCCTCC AAAATATC

48

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 103:

40

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 103:

TGTTTGGGTA CCCGGCGGAC ATTTATCACA C

31

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 104:

55

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

60

65

DE 196 54 610 A1

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 104:
ACAAACACAA TCGATTTGAT ACTAGATTTG TTTTAACCTAA TTAAAGGAGG AATAAAAATG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 105:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 54 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 105:
CTAATTAAAG GAGGAATAAA ATGAAAAAAA AAGAAACTTT TCCTCCAAAA TATC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 106:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 31 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 106:
TGTTTGGGTA CCCGGCGGAC ATTTATCACA C

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 107:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 44 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 107:
CAGCCCCGGGT AAAATGGAAA CGTTTCCTCC AAAATATCTT CATT

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 108:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 44 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 108:

CGTTTCCATT TTACCCGGGC TGAGCGAGAG GCTCTTCTGC GTGT

44

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 109:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 109:

CGCTCAGCCC GGGTAAAATG GAAACGTTGC CTCCAAAATA CCTGC

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 110:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 110:

CCATTTTACC CGGGCTGAGC GAGAGGCTCT TCTGCGTGT

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 111:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

60

65

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 111:

GAAAATAAGC TGCTTAGCTG CAGCTGAACC AAAATC 36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 112: 5

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear 10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA 15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 112:

CAGCTGCAGC TAAGCAGCTT ATTTTCACGG ATTG 34 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 113:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare 25
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA 30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 113: 35

AAAAATAAGC TGCTTAGCTG CAGCTGAACC AAAATC 36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 114: 40

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear 45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA 50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 114:

CAGCTGCAGC TAAGCAGCTT ATTTTTACTG ATTGG 35 55

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 115:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 102 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 115:

15 CTAGAAGGAG GAATAACATA TGGAAACTTT TGCTCCAAAA TATCTTCATT ATGATGAAGA 60
AACTAGTCAT CAGCTGCTGT GTGATAAAATG TCCGCCGGGT AC 102

20 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 116:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 94 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 116:

35 CCGGCAGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACTAGTTTC TTCATCATAA TGAAGATATT 60
TTGGAGCAAA AGTTTCCATA TGTTATTCCCT CCTT 94

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 117:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 117:

CTAGAAGGAG GAATAACATA TGGAAACTTT TCCTGCTAAA TATCTTCATT ATGATGAAGA 60
AA 62

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 118:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 62 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 118:

CTAGTTCTT CATCATAATG AAGATATTAA GCAGGAAAAG TTTCCATATG TTATTCTCC

60 15

TT

62

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 119:

20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 51 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 119:

Tyr His Tyr Tyr Asp Gln Asn Gly Arg Met Cys Glu Glu Cys His Met
1 5 10 15

35

Cys Gln Pro Gly His Phe Leu Val Lys His Cys Lys Gln Pro Lys Arg
20 25 30

Asp Thr Val Cys His Lys Pro Cys Glu Pro Gly Val Thr Tyr Thr Asp
35 40 45

40

Asp Trp His
50

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 120:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2432 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

50

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

55

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 124..1326

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 120:

	ATCAAAGGCA GGGCATACTT CCTGTTGCCCG AGACCTTATA TAAAACGTCA TGTTGCCCTG	60
5	GGCAGCAGAG AAGCACCTAG CACTGGCCCA GCGGCTGCCCG CCTGAGGTTT CCAGAGGACC	120
	ACA ATG AAC AAG TGG CTG TGC TGT GCA CTC CTG GTG TTC TTG GAC ATC Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Phe Leu Asp Ile	168
	1 5 10 15	
10	ATT GAA TGG ACA ACC CAG GAA ACC TTT CCT CCA AAA TAC TTG CAT TAT Ile Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr	216
	20 25 30	
15	GAC CCA GAA ACC GGA CGT CAG CTC TTG TGT GAC AAA TGT GCT CCT GGC Asp Pro Glu Thr Gly Arg Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly	264
	35 40 45	
20	ACC TAC CTA AAA CAG CAC TGC ACA GTC AGG AGG AAG ACA CTG TGT GTC Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val	312
	50 55 60	
	CCT TGC CCT GAC TAC TCT TAT ACA GAC AGC TGG CAC ACG AGT GAT GAA Pro Cys Pro Asp Tyr Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu	360
	65 70 75	
25	TGC GTG TAC TGC AGC CCC GTG TGC AAG GAA CTG CAG ACC GTG AAA CAG Cys Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Thr Val Lys Gln	408
	80 85 90 95	
30	GAG TGC AAC CGC ACC CAC AAC CGA GTG TGC GAA TGT GAG GAA GGG CGC Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg	456
	100 105 110	
35	TAC CTG GAG CTC GAA TTC TGC TTG AAG CAC CGG AGC TGT CCC CCA GGC Tyr Leu Glu Leu Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly	504
	115 120 125	
	TTG GGT GTG CTG CAG GCT GGG ACC CCA GAG CGA AAC ACG GTT TGC AAA Leu Gly Val Leu Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys	552
	130 135 140	
40	AGA TGT CCG GAT GGG TTC TTC TCA GGT GAG AGC TCA TCG AAA GCA CCC Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro	600
	145 150 155	
45	TGT AGG AAA CAC ACC AAC TGC AGC TCA CTT GGC CTC CTG CTA ATT CAG Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Ile Gln	648
	160 165 170 175	
50	AAA GGA AAT GCA ACA CAT GAC AAT GTA TGT TCC GGA AAC AGA GAA GCA Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala	696
	180 185 190	
	ACT CAA AAT TGT GGA ATA GAT GTC ACC CTG TGC GAA GAG GCA TTC TTC Thr Gln Asn Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe	744
	195 200 205	
55	AGG TTT GCT GTG CCT ACC AAG ATT ATA CCG AAT TGG CTG AGT GTT CTG Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu	792
	210 215 220	
60	GTG GAC AGT TTG CCT GGG ACC AAA GTG AAT GCA GAG AGT GTA GAG AGG	840

DE 196 54 610 A1

Val Asp Ser Leu Pr Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg		
225 230 235		
ATA AAA CGG AGA CAC AGC TCG CAA GAG CAA ACT TTC CAG CTA CTT AAG	888	
Ile Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		5
240 245 250 255		
CTG TGG AAG CAT CAA AAC AGA GAC CAG GAA ATG GTG AAG AAG ATC ATC	936	
Leu Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Ile Ile		
260 265 270		
CAA GAC ATT GAC CTC TGT GAA AGC AGT GTG CAA CGG CAT ATC GGC CAC	984	
Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Ile Gly His		
275 280 285		
GCG AAC CTC ACC ACA GAG CAG CTC CGC ATC TTG ATG GAG AGC TTG CCT	1032	15
Ala Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Arg Ile Leu Met Glu Ser Leu Pro		
290 295 300		
GGG AAG AAG ATC AGC CCA GAC GAG ATT GAG AGA ACG AGA AAG ACC TGC	1080	
Gly Lys Lys Ile Ser Pro Asp Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys		20
305 310 315		
AAA CCC AGC GAG CAG CTC CTG AAG CTA CTG AGC TTG TGG AGG ATC AAA	1128	
Lys Pro Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys		
320 325 330 335		
AAT GGA GAC CAA GAC ACC TTG AAG GGC CTG ATG TAC GCA CTC AAG CAC	1176	
Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His		
340 345 350		
TTG AAA GCA TAC CAC TTT CCC AAA ACC GTC ACC CAC AGT CTG AGG AAG	1224	30
Leu Lys Ala Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys		
355 360 365		
ACC ATC AGG TTC TTG CAC AGC TTC ACC ATG TAC CGA TTG TAT CAG AAA	1272	
Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys		35
370 375 380		
CTC TTT CTA GAA ATG ATA GGG AAT CAG GTT CAA TCA GTG AAG ATA AGC	1320	
Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser		
385 390 395		
TGC TTA TAGTTAGGAA TGGTCACTGG GCTGTTCTT CAGGATGGGC CAACACTGAT	1376	
Cys Leu		
400		
GGAGCAGATG GCTGCTTCTC CGGCTCTTGA AATGGCAGTT GATTCTTTC TCATCAGTTG	1436	45
GTGGGAATGA AGATCCTCCA GCCAACACA CACACTGGGG AGTCTGAGTC AGGAGAGTGA	1496	
GGCAGGCTAT TTGATAATTG TGCAAAGCTG CCAGGTGTAC ACCTAGAAAG TCAAGCACCC	1556	
TGAGAAAGAG GATATTTTA TAACCTCAAA CATAGGCCCT TTCTTCCTC TCCTTATGGA	1616	50
TGAGTACTCA GAAGGCTTCT ACTATCTTCT GTGTATCCC TAGATGAAGG CCTCTTTTAT	1676	
TTATTTTTT ATTCTTTTT TCAGGAGCTGG GGACCGAAC CAGGGCCTTG CGCTTGCGAG	1736	55
GCAAGTGCCTC TACCACTGAG CTAAATCTCC AACCCCTGAA GGCTCTTTC TTTCTGCCTC	1796	
TGATAGTCTA TGACATTCTT TTTCTACAA TTCTGATCAG GTGCACGGAGC CTTATCCCAT	1856	
TTGTAGGTTT CTAGGCAAGT TGACCGTTAG CTATTTTCC CTCTGAAGAT TTGATTGAG	1916	60

DE 196 54 610 A1

TTGCAGACTT GGCTAGACAA GCAGGGTAG GTTATGGTAG TTTATTTAAC AGACTGCCAC	1976
CAGGAGTCCA GTGTTCTTG TTCCTCTGTA GTTGTACCTA AGCTGACTCC AAGTACATTT	2036
5 AGTATGAAAA ATAATCAACA AATTTTATTTC CTTCTATCAA CATTGGCTAG CTTTGTTC	2096
GGGCACAAA AGAAACTACT ATATGGAGAA AGAATTGATA TTGCCCCAA CGTTCAACAA	2156
CCCAATAGTT TATCCAGCTG TCATGCCCTGG TTCAGTGTCT ACTGACTATG CGCCCTCTTA	2216
10 TTACTGCATG CAGTAATTCA ACTGGAAATA GTAATAATAA TAATAGAAAT AAAATCTAGA	2276
CTCCATTGGA TCTCTCTGAA TATGGGAATA TCTAACTTAA GAAGCTTGA GATTCAGTT	2336
15 GTGTTAAAGG CTTTTATTAA AAAGCTGATG CTCTCTGTA AAAGTTACTA ATATATCTGT	2396
AAGACTATTA CAGTATTGCT ATTTATATCC ATCCAG	2432

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 121:

- 20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 401 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

- 25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 121:

Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Phe Leu Asp Ile Ile	
1 5 10 15	
Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp	
35 20 25 30	
Pro Glu Thr Gly Arg Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr	
35 40 45	
Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro	
40 50 55 60	
Cys Pro Asp Tyr Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys	
65 70 75 80	
Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Thr Val Lys Gln Glu	
45 85 90 95	
Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Gly Arg Tyr	
100 105 110	
Leu Glu Leu Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Leu	
50 115 120 125	
Gly Val Leu Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg	
55 130 135 140	
Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys	
145 150 155 160	

60

65

DE 196 54 610 A1

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys
 165 170 175
 Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr
 180 185 190
 Gln Asn Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
 195 200 205
 Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
 210 215 220
 Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
 225 230 235 240
 Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
 245 250 255
 Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln
 260 265 270
 Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala
 275 280 285
 Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Arg Ile Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
 290 295 300
 Lys Lys Ile Ser Pro Asp Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys
 305 310 315 320
 Pro Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn
 325 330 335
 Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu
 340 345 350
 Lys Ala Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr
 355 360 365
 Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu
 370 375 380
 Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys
 385 390 395 400
 Leu

 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 122:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 1324 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
 (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 90..1292

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 122:

	CCTTATATAA ACGTCATGAT TGCCTGGCT GCAGAGACGC ACCTAGCACT GACCCAGCGG	60
5	CTGCCCTCCTG AGGTTTCCCC AGGACCACA ATG AAC AAG TGG CTG TGC TGC GCA Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala	113
	1 5	
10	CTC CTG GTG CTC CTG GAC ATC ATT GAA TGG ACA ACC CAG GAA ACC CTT Leu Leu Val Leu Leu Asp Ile Ile Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Leu 10 15 20	161
15	CCT CCA AAG TAC TTG CAT TAT GAC CCA GAA ACT GGT CAT CAG CTC CTG Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Pro Glu Thr Gly His Gln Leu Leu 25 30 35 40	209
20	TGT GAC AAA TGT GCT CCT GGC ACC TAC CTA AAA CAG CAC TGC ACA GTG Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val 45 50 55	257
25	AGG AGG AAG ACA TTG TGT GTC CCT TGC CCT GAC CAC TCT TAT ACG GAC Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro Cys Pro Asp His Ser Tyr Thr Asp 60 65 70	305
30	AGC TGG CAC ACC AGT GAT GAG TGT GTG TAT TGC AGC CCA GTG TGC AAG Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys 75 80 85	353
35	GAA CTG CAG TCC GTG AAG CAG GAG TGC AAC CGC ACC CAC AAC CGA GTG Glu Leu Gln Ser Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val 90 95 100	401
40	TGT GAG TGT GAG GAA GGG CGT TAC CTG GAG ATC GAA TTC TGC TTG AAC Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys 105 110 115 120	449
45	CAC CGG AGC TGT CCC CCG GGC TCC GGC GTG GTG CAA GCT GGA ACC CCA His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ser Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro 125 130 135	497
50	GAG CGA AAC ACA GTT TGC AAA AAA TGT CCA GAT GGG TTC TTC TCA GGT Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Lys Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly 140 145 150	545
55	GAG ACT TCA TCG AAA GCA CCC TGT ATA AAA CAC ACG AAC TGC AGC ACA Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Ile Lys His Thr Asn Cys Ser Thr 155 160 165	593
60	TTT GGC CTC CTG CTA ATT CAG AAA GGA AAT GCA ACA CAT GAC AAC GTG Phe Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val 170 175 180	641
65	TGT TCC GGA AAC AGA GAA GCC ACG CAA AAG TGT GGA ATA GAT GTC ACC Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr 185 190 195 200	689
70	CTG TGT GAA GAG GCC TTC TTC AGG TTT GCT GTT CCT ACC AAG ATT ATA Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile 205 210 215	737
75	CCA AAT TGG CTG AGT GTT TTG GTG GAC AGT TTG CCT GGG ACC AAA GTG Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val 220 225 230	785

60

65

DE 196 54 610 A1

AAT GCC GAG AGT GTA GAG AGG ATA AAA CGG AGA CAC AGC TCA CAA GAG Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu 235 240 245	833
CAA ACC TTC CAG CTG CTG AAG CTG TGG AAA CAT CAA AAC AGA GAC CAG Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln 250 255 260	881 5
GAA ATG GTG AAG AAG ATC ATC CAA GAC ATT GAC CTC TGT GAA AGC AGC Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser 265 270 275 280	929 10
GTG CAG CGG CAT CTC GGC CAC TCG AAC CTC ACC ACA GAG CAG CTT CTT Val Gin Arg His Leu Gly His Ser Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Leu 285 290 295	977
GCC TTG ATG GAG AGC CTG CCT GGG AAG AAG ATC AGC CCA GAA GAG ATT Ala Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Ile Ser Pro Glu Glu Ile 300 305 310	1025 15
GAG AGA ACG AGA AAG ACC TGC AAA TCG AGC GAG CAG CTC CTG AAG CTA Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys Ser Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu 315 320 325	1073 20
CTC AGT TTA TGG AGG ATC AAA AAT GGT GAC CAA GAC ACC TTG AAG GGC Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly 330 335 340	1121 25
CTG ATG TAT GCC CTC AAG CAC TTG AAA ACA TCC CAC TTT CCC AAA ACT Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu Lys Thr Ser His Phe Pro Lys Thr 345 350 355 360	1169 30
GTC ACC CAC AGT CTG AGG AAG ACC ATG AGG TTC CTG CAC AGC TTC ACA Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr Met Arg Phe Leu His Ser Phe Thr 365 370 375	1217
ATG TAC AGA CTG TAT CAG AAG CTC TTT TTA GAA ATG ATA GGG AAT CAG Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln 380 385 390	1265 35
GTT CAA TCC GTG AAA ATA AGC TGC TTA TAACTAGGAA TGGTCACTGG Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu 395 400	1312 40
GCTGTTCTT CA	
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 123:	45
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 401 Aminosäuren	
(B) ART: Aminosäure	
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein	

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 123:

Met	Asn	Lys	Trp	Leu	Cys	Cys	Ala	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Asp	Ile	Ile
1				5				10					15		
Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Leu Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp															
	20				25					30					
Pro Glu Thr Gly His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr															
	35				40					45					
Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro															
	50				55					60					
Cys Pro Asp His Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys															
	65				70					75				80	
Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Ser Val Lys Gln Glu															
	85				90					95					
Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr															
	100				105					110					
Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ser															
	115				120					125					
Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Lys															
	130				135					140					
Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys															
	145				150					155				160	
Ile Lys His Thr Asn Cys Ser Thr Phe Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys															
	165				170					175					
Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr															
	180				185					190					
Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Ala Phe Phe Arg															
	195				200					205					
Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val															
	210				215					220					
Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile															
	225				230					235				240	
Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu															
	245				250					255					
Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln															
	260				265					270					
Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Leu Gly His Ser															
	275				280					285					
Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Leu Ala Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly															
	290				295					300					
Lys Lys Ile Ser Pro Glu Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys															
	305				310					315				320	
Ser Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn															
	325				330					335					

DE 196 54 610 A1

Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu
 340 345 350

Lys Thr Ser His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr
 355 360 365

5

Met Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu
 370 375 380

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys
 385 390 395 400

10

Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 124:

15

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LANGE: 1355 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

25

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 94..1296

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 124:

GTATATATAA CGTGATGAGC GTACGGGTGC GGAGACGCCAC CGGAGCGCTC GCCCAGCCGC

60

CGCTCCAAGC CCCTGAGGTT TCCGGGGACC ACA ATG AAC AAG TTG CTG TGC TGC
 Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys
 1 5

114 35

GCG CTC GTG TTT CTG GAC ATC TCC ATT AAG TGG ACC ACC CAG GAA ACG
 Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr
 10 15 20

162 40

TTT CCT CCA AAG TAC CTT CAT TAT GAC GAA GAA ACC TCT CAT CAG CTG
 Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu
 25 30 35

210

45

TTG TGT GAC AAA TGT CCT CCT GGT ACC TAC CTA AAA CAA CAC TGT ACA
 Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr
 40 45 50 55

258

GCA AAG TGG AAG ACC GTG TGC GCC CCT TGC CCT GAC CAC TAC TAC ACA
 Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr
 60 65 70

306 50

GAC AGC TGG CAC ACC AGT GAC GAG TGT CTA TAC TGC AGC CCC GTG TGC
 Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys
 75 80 85

354

55

AAG GAG CTG CAG TAC GTC AAG CAG GAG TGC AAT CGC ACC CAC AAC CGC
 Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg
 90 95 100

402

60

65

DE 196 54 610 A1

	GTG TGC GAA TGC AAG GAA GGG CGC TAC CTT GAG ATA GAG TTC TGC TTG Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu 105 110 115	450
5	AAA CAT AGG AGC TGC CCT CCT GGA TTT GGA GTG GTG CAA GCT GGA ACC Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr 120 125 130 135	498
10	CCA GAG CGA AAT ACA GTT TGC AAA AGA TGT CCA GAT GGG TTC TTC TCA Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser 140 145 150	546
15	AAT GAG ACG TCA TCT AAA GCA CCC TGT AGA AAA CAC ACA AAT TGC AGT Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser 155 160 165	594
20	GTC TTT GGT CTC CTG CTA ACT CAG AAA GGA AAT GCA ACA CAC GAC AAC Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn 170 175 180	642
25	ATA TGT TCC GGA AAC AGT GAA TCA ACT CAA AAA TGT GGA ATA GAT GTT Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val 185 190 195	690
30	ACC CTG TGT GAG GAG GCA TTC TTC AGG TTT GCT GTT CCT ACA AAG TTT Thr Leu Cys Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe 200 205 210 215	738
35	ACG CCT AAC TGG CTT AGT GTC TTG GTA GAC AAT TTG CCT GGC ACC AAA Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys 220 225 230	786
40	GTA AAC GCA GAG ACT GTC GAG AGG ATA AAA CGG CAA CAC AGC TCA CAA Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser Ser Gln 235 240 245	834
45	GAA CAG ACT TTC CAG CTG CTG AAG TTA TGG AAA CAT CAA AAC AAA GCC Glu Gin Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Ala 250 255 260	882
50	CAA GAT ATA GTC AAG AAG ATC ATC CAA GAT ATT GAC CTC TGT GAA AAC Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn 265 270 275	930
55	AGC GTG CAG CGG CAC ATT GGA CAT GCT AAC CTC ACC TTC GAG CAG CTT Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu 280 285 290 295	978
60	CGT AGC TTG ATG GAA AGC TTA CCG GGA AAG AAA GTG GGA GCA GAA GAC Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp 300 305 310	1026
65	ATT GAA AAA ACA ATA AAG GCA TGC AAA CCC AGT GAC CAG ATC CTG AAG Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys 315 320 325	1074
70	CTG CTC AGT TTG TGG CGA ATA AAA AAT GGC GAC CAA GAC ACC TTG AAG Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys 330 335 340	1122
75	GGC CTA ATG CAC GCA CTA AAG CAC TCA AAG ACG TAC CAC TTT CCC AAA Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys 345 350 355	1170

DE 196 54 610 A1

ACT GTC ACT CAG AGT CTA AAG AAG ACC ATC AGG TTC CTT CAC AGC TTC Thr Val Thr Gln Ser L u Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe 360 365 370 375	1218
ACA ATG TAC AAA TTG TAT CAG AAG TTA TTT TTA GAA ATG ATA GGT AAC Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn 380 385 390	1266 5
CAG GTC CAA TCA GTA AAA ATA AGC TGC TTA TAACTGGAAA TGGCCATTGA Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu 395 400	1316 10
GCTGTTTCCT CACAATTGGC GAGATCCCAT GGATGATAA	1355
 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 125: 15	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 401 Aminosäuren	
(B) ART: Aminosäure	
(C) TOPOLOGIE: linear 20	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein	
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 125: 25	
Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile 1 5 10 15	30
Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp 20 25 30	35
Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr 35 40 45	40
Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro 50 55 60	45
Cys Pro Asp His Tyr Tyr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys 65 70 75 80	50
Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu 85 90 95	55
Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr 100 105 110	60
Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe 115 120 125	65
Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg 130 135 140	70
Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys 145 150 155 160	75
Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys 165 170 175	80
 65	

DE 196 54 610 A1

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr
180 185 190

5 Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
195 200 205

Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
210 215 220

10 Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
225 230 235 240

Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
245 250 255

15 Trp Lys His Gln Asn Lys Ala Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln
260 265 270

Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala
275 280 285

20 Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
290 295 300

25 Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys
305 310 315 320

Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn
325 330 335

30 Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser
340 345 350

Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr
355 360 365

35 Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu
370 375 380

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys
385 390 395 400

40 Leu

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 126:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 139 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- 50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 126:

Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys	15	
1 5 10 15		5
Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro	30	
20 25 30		
Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala	45	
35 40 45		10
Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys	60	
50 55 60		
Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr	80	
65 70 75 80		15
Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn	95	
85 90 95		
Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His	110	
100 105 110		20
Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly	125	
115 120 125		
Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys	135	
130 135		25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 127:

30

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

40

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 127:

CCGGCGGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GAGAAGTTTC TTCAATCCA

48

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 128:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 219 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

50

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 128:

Met Leu Gly Ile Trp Thr Leu Leu Pro Leu Val Leu Thr Ser Val Ala
1 5 10 15

Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser
20 25 30

Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Val Glu Thr Gln Asn
35 40 45

Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro
50 55 60

Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro
65 70 75 80

Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His
85 90 95

Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly
100 105 110

Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg
115 120 125

Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp
130 135 140

Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr
145 150 155 160

Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn Leu Gly Trp
165 170 175

Leu Cys Leu Leu Leu Pro Ile Pro Leu Ile Val Trp Val Lys Arg
180 185 190

Lys Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys His Arg Lys Glu Asn Gln Gly
195 200 205

Ser His Glu Ser Pro Thr Leu Asn Pro Glu Thr
210 215

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 129:

- 45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 280 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
- 50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 129:

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu	15	
1 5 10 15		5
Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro	30	
20 25 30		10
His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys	45	
35 40 45		10
Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys	60	
50 55		15
Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gln Asp Thr Asp	80	
65 70 75 80		15
Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu	95	
85 90 95		
Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val	110	
100 105 110		20
Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg	125	
115 120 125		
Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe	140	
130 135 140		25
Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu	160	
145 150 155 160		30
Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu	175	
165 170 175		
Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr	190	
180 185 190		35
Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser	205	
195 200 205		
Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu	220	
210 215 220		40
Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys	240	
225 230 235 240		
Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu	255	
245 250 255		45
Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser	270	
260 265 270		
Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr		50
275 280		

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 130:

55

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 207 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

60

65

DE 196 54 610 A1

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Prot in

5 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 130:

Met Leu Arg Leu Ile Ala Leu Leu Val Cys Val Val Val Tyr Val Tyr Gly
1 5 10 15

10 Asp Asp Val Pro Tyr Ser Ser Asn Gln Gly Lys Cys Gly Gly His Asp
20 25 30

Tyr Glu Lys Asp Gly Leu Cys Cys Ala Ser Cys His Pro Gly Phe Tyr
35 40 45

15 Ala Ser Arg Leu Cys Gly Pro Gly Ser Asn Thr Val Cys Ser Pro Cys
50 55 60

20 Glu Asp Gly Thr Phe Thr Ala Ser Thr Asn His Ala Pro Ala Cys Val
65 70 75 80

Ser Cys Arg Gly Pro Cys Thr Gly His Leu Ser Glu Ser Gln Pro Cys
85 90 95

25 Asp Arg Thr His Asp Arg Val Cys Asn Cys Ser Thr Gly Asn Tyr Cys
100 105 110

Leu Leu Lys Gly Gln Asn Gly Cys Arg Ile Cys Ala Pro Gln Thr Lys
115 120 125

30 Cys Pro Ala Gly Tyr Gly Val Ser Gly His Thr Arg Ala Gly Asp Thr
130 135 140

Leu Cys Glu Lys Cys Pro Pro His Thr Tyr Ser Asp Ser Leu Ser Pro
145 150 155 160

35 Thr Glu Arg Cys Gly Thr Ser Phe Asn Tyr Ile Ser Val Gly Phe Asn
165 170 175

Leu Tyr Pro Val Asn Glu Thr Ser Cys Thr Thr Thr Ala Gly His Asn
180 185 190

40 Glu Val Ile Lys Thr Lys Glu Phe Thr Val Thr Leu Asn Tyr Thr
195 200 205

45 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 131:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 227 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 131:

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15 5

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45 10

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80 15

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110 20

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140 25

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160 30

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
180 185 190 35

Asn Ala Ser Arg Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
210 215 220 40

Gln His Thr
225 45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 132:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 197 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 132:

Met Val Ser Leu Pr Arg Leu Cys Ala Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1 5 10 15

Ala Val His Leu Gly Gln Cys Val Thr Cys Ser Asp Lys Gln Tyr Leu
20 25 30

His Asp Gly Gln Cys Cys Asp Leu Cys Gln Pro Gly Ser Arg Leu Thr
35 40 45

Ser His Cys Thr Ala Leu Glu Lys Thr Gln Cys His Pro Cys Asp Ser
50 55 60

Gly Glu Phe Ser Ala Gln Trp Asn Arg Glu Ile Arg Cys His Gln His
65 70 75 80

Arg His Cys Glu Pro Asn Gln Gly Leu Arg Val Lys Lys Glu Gly Thr
85 90 95

Ala Glu Ser Asp Thr Val Cys Thr Cys Lys Glu Gly Gln His Cys Thr
100 105 110

Ser Lys Asp Cys Glu Ala Cys Ala Gln His Thr Pro Cys Ile Pro Gly
115 120 125

Phe Gly Val Met Glu Met Ala Thr Glu Thr Thr Asp Thr Val Cys His
130 135 140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Gln Ser Ser Leu Phe Glu Lys
145 150 155 160

Cys Tyr Pro Trp Thr Ser Cys Glu Asp Lys Asn Leu Glu Val Leu Gln
165 170 175

Lys Gly Thr Ser Gln Thr Asn Val Ile Cys Gly Leu Lys Ser Arg Met
180 185 190

Arg Ala Leu Leu Val
195

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 133:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 208 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

- 50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 133:

Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Phe Leu Asp Ile Ile
1 5 10 15

Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
20 25 30

DE 196 54 610 A1

Pr Glu Thr Gly Arg Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr
 35 40 45
 Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro
 50 55 60 65
 Cys Pro Asp Tyr Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
 65 70 75 80
 Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Thr Val Lys Gln Glu
 85 90 95
 Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr
 100 105 110
 Leu Glu Leu Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Leu
 115 120 125
 Gly Val Leu Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg
 130 135 140
 Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
 145 150 155 160
 Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys
 165 170 175
 Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr
 180 185 190
 Gln Asn Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
 195 200 205

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 134:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 224 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 134:

Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys
 20 25 30
 Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn
 35 40 45
 Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys
 50 55 60
 Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr
 65 70 75 80

DE 196 54 610 A1

Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser
85 90 95

5 Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly
100 105 110

Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys
115 120 125

10 Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr
130 135 140

Val Cys Glu Glu Cys Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His
145 150 155 160

15 Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln
165 170 175

Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro
180 185 190

20 Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr
195 200 205

Ala Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile
210 215 220

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 135:

- 30 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 205 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

- 35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

40 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 135:

Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Phe Leu Leu Leu Gly Leu
1 5 10 15

45 Ser Leu Gly Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro
20 25 30

Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val
35 40 45

50 Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Glu Pro
50 55 60

Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr
65 70 75 80

55 Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro
85 90 95

60 Thr Glu Asp Thr Val Cys Gln Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln
100 105 110

DE 196 54 610 A1

Asp Ser Ser His Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly			
115	120	125	
His Phe Ser Pro Gly Ser Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys			
130	135	140	
Thr Leu Ser Gly Lys Gln Ile Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp			
145	150	155	160
Thr Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr			10
165	170	175	
Gln Arg Thr Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp			
180	185	190	
Pro Arg Thr Ser Gln Leu Pro Ser Thr Pro Thr Leu Val			15
195	200	205	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 136:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 191 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 136:	30		
Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val			
1	5	10	15
Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln		35	
20	25	30	
Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro		40	
35	40	45	
Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys		40	
50	55	60	
Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr		45	
65	70	75	80
His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro			50
85	90	95	
Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr			55
100	105	110	
Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn			60
115	120	125	
Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg			65
130	135	140	
Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro			70
145	150	155	160

DE 196 54 610 A1

Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pr Glu
165 170 175

Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu
180 185 190

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 137:

10 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 54 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 137:

TATGGATGAA GAAACTTCTC ATCAGCTGCT GTGTGATAAAA TGTCCGCCGG GTAC

54

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 138:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 380 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 138:

40 Glu Thr Leu Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Pro Glu Thr Gly His
1 5 10 15

Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His
20 25 30

45 Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro Cys Pro Asp His Ser
35 40 45

Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Val Tyr Cys Ser Pro
50 55 60

50 Val Cys Lys Glu Leu Gln Ser Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His
65 70 75 80

Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe
85 90 95

55 Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ser Gly Val Val Gln Ala
100 105 110

60 Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Lys Cys Pro Asp Gly Phe
115 120 125

65

DE 196 54 610 A1

Phe Ser Gly Glu Thr S r Ser Lys Ala Pro Cys Ile Lys His Thr Asn			
130	135	140	
Cys Ser Thr Phe Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys Gly Asn Ala Thr His			
145	150	155	160
Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr Gln Lys Cys Gly Ile			
165	170	175	
Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr			10
180	185	190	
Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Ser Leu Pro Gly			
195	200	205	
Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Arg His Ser			15
210	215	220	
Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn			
225	230	235	240
Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys			20
245	250	255	
Glu Ser Ser Val Gln Arg His Leu Gly His Ser Asn Leu Thr Thr Glu			
260	265	270	25
Gln Leu Leu Ala Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Ile Ser Pro			
275	280	285	
Glu Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys Ser Ser Glu Gln Leu			30
290	295	300	
Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr			
305	310	315	320
Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu Lys Thr Ser His Phe			
325	330	335	35
Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr Met Arg Phe Leu His			
340	345	350	
Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile			40
355	360	365	
Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu			
370	375	380	45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 139:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 380 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

50

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 139:

	Glu Thr Phe Pr Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His	
5	1 5 10 15	
	Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His	
5	20 25 30	
10	Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr	
	35 40 45	
	Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro	
	50 55 60	
15	Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His	
	65 70 75 80	
	Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe	
	85 90 95	
20	Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala	
	100 105 110	
	Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe	
	115 120 125	
25	Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn	
	130 135 140	
	Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His	
30	145 150 155 160	
	Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile	
	165 170 175	
35	Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr	
	180 185 190	
	Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly	
	195 200 205	
40	Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser	
	210 215 220	
	Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn	
45	225 230 235 240	
	Lys Ala Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys	
	245 250 255	
50	Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu	
	260 265 270	
	Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala	
	275 280 285	
55	Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile	
	290 295 300	
	Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr	
	305 310 315 320	
60	Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe	
	325 330 335	

DE 196 54 610 A1

Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His
340 345 350

Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile
355 360 365

Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu
370 375 380

5

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 140:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 140:

TGGACCACCC AGAAAGTACCT TCATTATGAC

30

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 141:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 141:

GTCATAATGA AGGTACTTCT GGGTGGTCCA

30

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 142:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 142:

GGACCACCCA GCTTCATTAT GACGAAGAAA C

31

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 143:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 143:

15 GTTTCTTCGT CATAATGAAG CTGGGTGGTC C

31

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 144:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 144:

GTGGACCACC CAGGACGAAG AAACCTCTC

29

35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 145:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 145:

50 GAGAGGTTTC TTTCGTCTGG GTGGTCCAC

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 146:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

60 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 146:	
CGTTTCCTCC AAAGTTCTT CATTATGAC	29
	5
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 147:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare	
(B) ART: Nukleinsäure	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	10
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA	
	15
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 147:	
GTCATAATGA AGGAACTTG GAGGAAACG	29 20
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 148:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 32 Basenpaare	25
(B) ART: Nukleinsäure	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA	30
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 148:	35
GGAAACGTTT CCTGCAAAGT ACCTTCATTA TG	32
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 149:	40
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 32 Basenpaare	
(B) ART: Nukleinsäure	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: linear	45
(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA	
	50
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 149:	
CATAATGAAG GTACTTGCA GGAAACGTTT CC	32
	55
	60
	65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 150:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 150:

15 CACGCAAAAG TCGGGAATAG ATGTCAC

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 151:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 151:

GTGACATCTA TTCCCGACTT TTGCGTG

27

35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 152:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 152:

50 CACCCTGTCT GAAGAGGGCT TCTTC

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 153:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 153:

GAAGAAGGCC TCTTCCGACA GGGTG

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 154:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 154:

TGACCTCTCG GAAAGCAGCG TGCA

24 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 155:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 155:

35

TGCACGCTGC TTTCCGAGAG GTCA

24

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 156:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 156:

CCTCGAAATC GAGCGAGCAG CTCC

24

55

60

65

DE 196 54 610 A1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 157:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 157:

CGATTTCGAG GTCTTCTCG TTCTC

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 158:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 158:

CCGTGAAAAT AAGCTCGTTA TAACTAGGAA TGG

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 159:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 159:

CCATTCCCTAG TTATAACGAG CTTATTTCA CGG

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 160:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 160:
CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG 38
5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 161:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 44 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang 10
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA 15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 161:
CCTCTCTCGA GTCAAGGTGAC ATCTATTCCA CACTTTGCG TGCG 44 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 162:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 38 Basenpaare 25
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA 30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 162:
CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG 38 35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 163:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 38 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang 45
(D) TOPOLOGIE: linear
(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA 50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 163:
CCTCTCTCGA GTCAAGGAAC AGCAAACCTG AAGAAGGC 38 55

60

65

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 164:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 164:

15 CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 165:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

25 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 165:

CCTCTCTCGA GTCACTCTGT GGTGAGGTTC GAGTGGCC

38

35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 166:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

40 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 166:

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG

38

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 167:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

55 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

60

65

DE 196 54 610 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 167:

CCTCTCTCGA GTCAGGATGT TTTCAAGTGC TTGAGGGC

38

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 168:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 16 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 168:

Met Lys His His His His His Ala Ser Val Asn Ala Leu Glu
1 5 10 15

20

Patentansprüche

25

1. Isolierte Nukleinsäure, die für ein Polypeptid kodiert, welches mindestens eine der biologischen Aktivitäten von OPG umfaßt, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- a) den in den Fig. 2B—2C (SEQ ID NO: 120), 9A—9B (SEQ ID NO: 122), und 9C—9D (SEQ ID NO: 124) dargestellten Nukleinsäuren oder komplementären Strängen derselben;
- b) Nukleinsäuren, die unter stringenten Bedingungen mit den Polypeptid-kodierenden Regionen gemäß Darstellung in den Fig. 2B—2C (SEQ ID NO: 120), 9A—9B, (SEQ ID NO: 122), und 9C—9D (SEQ ID NO: 124) hybridisieren;
- c) Nukleinsäuren, die unter stringenten Bedingungen mit den in Fig. 1A dargestellten Nukleotiden 148 bis 373 einschließlich hybridisieren; und
- d) Nukleinsäuren, die gegenüber den Nukleinsäuren gemäß (a), (b) und (c) degeneriert sind.

35

2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, welche cDNA, genomische DNA, synthetische DNA oder RNA ist.

40

3. Polypeptid, kodiert von der Nukleinsäure gemäß Anspruch 1.

4. Nukleinsäure nach Anspruch 1, welche eine oder mehrere für die Expression in Escherichia coli bevorzugte Kodons einschließt.

5. Nukleinsäure nach Anspruch 1 mit einem daran angehefteten nachweisbaren Marker.

45

6. Nukleinsäure nach Anspruch 1, umfassend die Polypeptid-kodierende Region der Fig. 2B—2C (SEQ ID NO: 120), 9A—9B (SEQ ID NO: 122) oder 9C—9D (SEQ ID NO: 124).

7. Nukleinsäure nach Anspruch 6 mit der in Fig. 9C—D dargestellten Sequenz (SEQ ID NO: 124) der Nukleotide 158 bis 1297.

8. Expressionsvektor, welcher die Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 umfaßt.

50

9. Expressionsvektor nach Anspruch 8, bei dem die Nukleinsäure die Polypeptid-kodierende Region gemäß Darstellung in Fig. 9C—9D (SEQ ID NO: 124) umfaßt.

10. Wirtszelle, transformiert oder transfiziert mit dem Expressionsvektor gemäß Anspruch 8.

55

11. Wirtszelle nach Anspruch 10, welche eine eukaryontische Zelle ist.

12. Wirtszelle nach Anspruch 11, welche ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus CHO-, COS-, 293-, 3T3-, CV-1- und BHK-Zellen.

60

13. Wirtszelle nach Anspruch 10, welche eine prokaryontische Zelle ist.

14. Wirtszelle nach Anspruch 13, welche Escherichia coli ist.

15. Transgener Säuger, welcher den Expressionsvektor gemäß Anspruch 8 umfaßt.

65

16. Transgener Säuger gemäß Anspruch 15, welcher ein Nager ist.

17. Transgener Säuger gemäß Anspruch 16, welcher eine Maus ist.

18. Verfahren zur Herstellung von OPG mit den folgenden Schritten:

Kultivieren von Wirtszellen, die mit der Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 transformiert oder transfiziert sind, unter geeigneten Nährstoffbedingungen; und

Isolieren des Polypeptidprodukts der Expression der Nukleinsäuren.

70

19. Gereinigtes und isoliertes Polypeptid, welches OPG umfaßt.

20. Polypeptid nach Anspruch 19, welches Säuger-OPG ist.

21. Polypeptid nach Anspruch 20, welches humanes OPG ist.

22. Polypeptid nach Anspruch 19, welches im wesentlichen frei von anderen humanen Proteinen ist.

23. Polypeptid nach Anspruch 21 mit der Aminosäuresequenz gemäß Darstellung in d n Fig. 2B—2C (SEQ ID NO: 121), 9A—9B (SEQ ID NO: 123) oder 9C—9D (SEQ ID NO: 125), oder ein Derivat desselben.

24. Polypeptid nach Anspruch 23 mit der Aminosäuresequenz gemäß Darstellung in Fig. 9C—9D (SEQ ID NO: 125) von den Resten 22 bis 401 einschließlich.

DE 196 54 610 A1

25. Polypeptid nach Anspruch 23 mit der Aminosäuresequenz gemäß Darstellung in Fig. 9C–9D (SEQ ID NO: 125) von den Resten 32 bis 401 einschließlich.

26. Polypeptid nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Produkt der Expression einer exogenen DNA-Sequenz ist.

5 27. Polypeptid nach Anspruch 26, wobei die DNA cDNA, genomische DNA oder synthetische DNA ist.

28. Polypeptid nach Anspruch 19, welches mit einem wasserlöslichen Polymer modifiziert worden ist.

29. Polypeptid nach Anspruch 28, wobei das wasserlösliche Polymer Polyethylenglykol ist.

30. Polypeptid, umfassend:

eine Aminosäuresequenz von mindestens etwa 164 Aminosäuren, die 4 Cystein-reiche Domänen umfassen, welche für die Cystein-reichen Domänen von extrazellulären Regionen des Tumornekrosefaktor-Rezeptors charakteristisch sind; und eine die Knochendichte erhöhende Aktivität.

31. Polypeptid, umfassend die Aminosäuresequenz gemäß Darstellung in den Fig. 2B–2C (SEQ ID NO: 121), 9A–9B (SEQ ID NO: 123) oder 9C–9D (SEQ ID NO: 125) mit einem Aminoterminus am Rest 22, und bei dem die Aminosäuren 1 bis 216 vom Carboxyterminus deletiert sind.

15 32. Polypeptid nach Anspruch 31, umfassend die Aminosäuresequenz von den Resten 22–185, 22–189, 22–194, oder 22–201 einschließlich.

33. Polypeptid nach Anspruch 32, ferner umfassend eine Fc-Region von humanem IgG1, die sich vom Carboxyterminus erstreckt.

20 34. Polypeptid, umfassend die Aminosäuresequenz gemäß Darstellung in den Fig. 2B–2C (SEQ ID NO: 121), 9A–9B (SEQ ID NO: 123) oder 9C–9D (SEQ ID NO: 125) mit einem Aminoterminus am Rest 22, bei dem die Aminosäuren 1 bis 10 vom Aminoterminus und, fakultativ, die Aminosäuren 1 bis 216 vom Carboxyterminus deletiert sind.

25 35. Polypeptid nach Anspruch 34, umfassend die Aminosäuresequenz von den Resten 27–185, 27–189, 27–194, 17–401, oder 32–401 einschließlich.

36. Polypeptid nach Anspruch 35, ferner umfassend eine Fc-Region von humanem IgG1, die sich vom Carboxyterminus erstreckt.

37. Polypeptid, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

30 huOPG [22-201]-Fc

huOPG [22-401]-Fc

huOPG [22-180]-Fc

huOPG met [22-401]-Fc

huOPG Fc-met[22-401]

35 huOPG met [22-185]

huOPG met [22-189]

huOPG met [22-194]

huOPG met [27-185]

huOPG met [27-189]

40 huOPG met [27-194]

huOPG met [32-401]

huOPG met-lys[22-401]

huOPG met [22-401]

huOPG met [22-401]-Fc (P25A)

45 huOPG met [22-401](P25A)

huOPG met [22-401](P26A)

huOPG met [22-401](P26D)

huOPG met [22-194](P25A)

50 huOPG met [22-194](P26A)

huOPG met met-(lys)₃[22-401]

huOPG met met-arg-gly-ser-(his)₆[22-401].

38. Nukleinsäure, die für das Polypeptid gemäß Anspruch 37 kodiert.

39. Antikörper oder Fragment desselben, welcher spezifisch an OPG bindet.

40. Antikörper nach Anspruch 39, welcher ein monoklonaler Antikörper ist.

55 41. Verfahren zum Nachweis des Vorhandenseins von OPG in einer biologischen Probe mit den Schritten: Inkubieren der Probe mit dem Antikörper gemäß Anspruch 39 unter Bedingungen, die dem Antikörper das Binden an OPG erlauben; und Nachweisen des gebundenen Antikörpers.

42. Verfahren zur Ermittlung der Fähigkeit einer ausgewählten Substanz zur Bindung an OPG mit den Schritten:

Inkubieren von OPG mit der ausgewählten Substanz unter Bedingungen, die eine Bindung erlauben; und Messen der gebundenen Substanz.

43. Verwendung einer für OPG kodierenden Nukleinsäure zur Regulation der OPG-Werte bei Säugern.

44. Verwendung nach Anspruch 43, bei der die Nukleinsäure einen Anstieg der Gewebemengen an OPG fördert.

45. Verwendung nach Anspruch 44, bei der der Säuger ein Mensch ist.

46. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine therapeutisch wirksame Menge von OPG in einem pharmazeutisch verträglichen Träger, Adjuvans, Löslichmacher, Stabilisator und/oder Antioxidationsmittel.

DE 196 54 610 A1

47. Zusammensetzung nach Anspruch 46, bei der das OPG humanes OPG ist.
48. Zusammensetzung nach Anspruch 47, bei der das OPG die Amin säuresequenz gemäß Darstellung in Fig. 9B aufweist.
49. Verwendung des Polypeptids gemäß Anspruch 19 zur Behandlung einer Knochenstörung.
50. Verwendung nach Anspruch 49, bei der das Polypeptid humanes OPG ist.
51. Verwendung nach Anspruch 49, bei der die Knochenstörung übermäßiger Knochenschwund ist.
52. Verwendung nach Anspruch 51, bei der die Knochenstörung ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Osteoporose, Paget-Krankheit, Hyperkalzämie, Hyperparathyreoidismus, Steroid-induzierte Osteopenie, Knochenschwund aufgrund rheumatoider Arthritis, Knochenschwund aufgrund einer Osteomyelitis, osteolytische Metastase, und paradontalem Knochenschwund.
53. Verwendung nach Anspruch 49 zusammen mit einer Substanz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Knochen-morphogenen Proteinen BMP-1 bis BMP-12, Vertretern der TGF- β -Familie, IL-1-Inhibitoren, TNFa-Inhibitoren, Parathormon und Analoga desselben, Parathormon-verwandtem Protein und Analoga desselben, Prostaglandine der E-Reihe, Bisphosphonaten, und Knochen-stärkenden Mineralien.
54. Osteoprotegerin-Multimer, welches aus Osteoprotegerin-Monomeren besteht.
55. Multimer nach Anspruch 54, welches ein Dimer ist.
56. Multimer nach Anspruch 54, gebildet durch intermolekulare Disulfidbindungen.
57. Multimer nach Anspruch 54, gebildet durch Assoziation von Fc-Regionen, die von humanem IgG1 abgeleitet sind.
58. Multimer nach Anspruch 54, welches im wesentlichen frei ist von Osteoprotegerin-Monomeren und inaktiven Multimeren.
59. Multimer nach Anspruch 54, bei dem die Monomere die Aminosäuresequenz gemäß Darstellung in Fig. 9C–9D (SEQ ID NO: 125) von den Resten 22–401, oder ein Derivat derselben umfassen.
60. Multimer nach Anspruch 54, bei dem die Monomere die Aminosäuresequenz gemäß Darstellung in Fig. 9C–9D (SEQ ID NO: 125) von den Resten 22 bis 194 umfassen.

Hierzu 46 Seite(n) Zeichnungen

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

FIG. 1A

Nummer:

Int. Cl. 6:

Offenl gungstag:

DE 196 54 610 A1

.C07 K 14/715

26. Juni 1997

FIG. 1B

69 YLHYDPETGRQLLCDKCAPGTYLQHCK. TVRRKTLV. PCPDX. SYTDSW
 | | | | | | | |
 | | | | | | |
 6 YHYDQNGRMCCECHMCQPGHFLVKHCKOPKRDTVCHKPCEPGVVTYDDW

FRI-1 116 H
1 56 H

FIG. IC

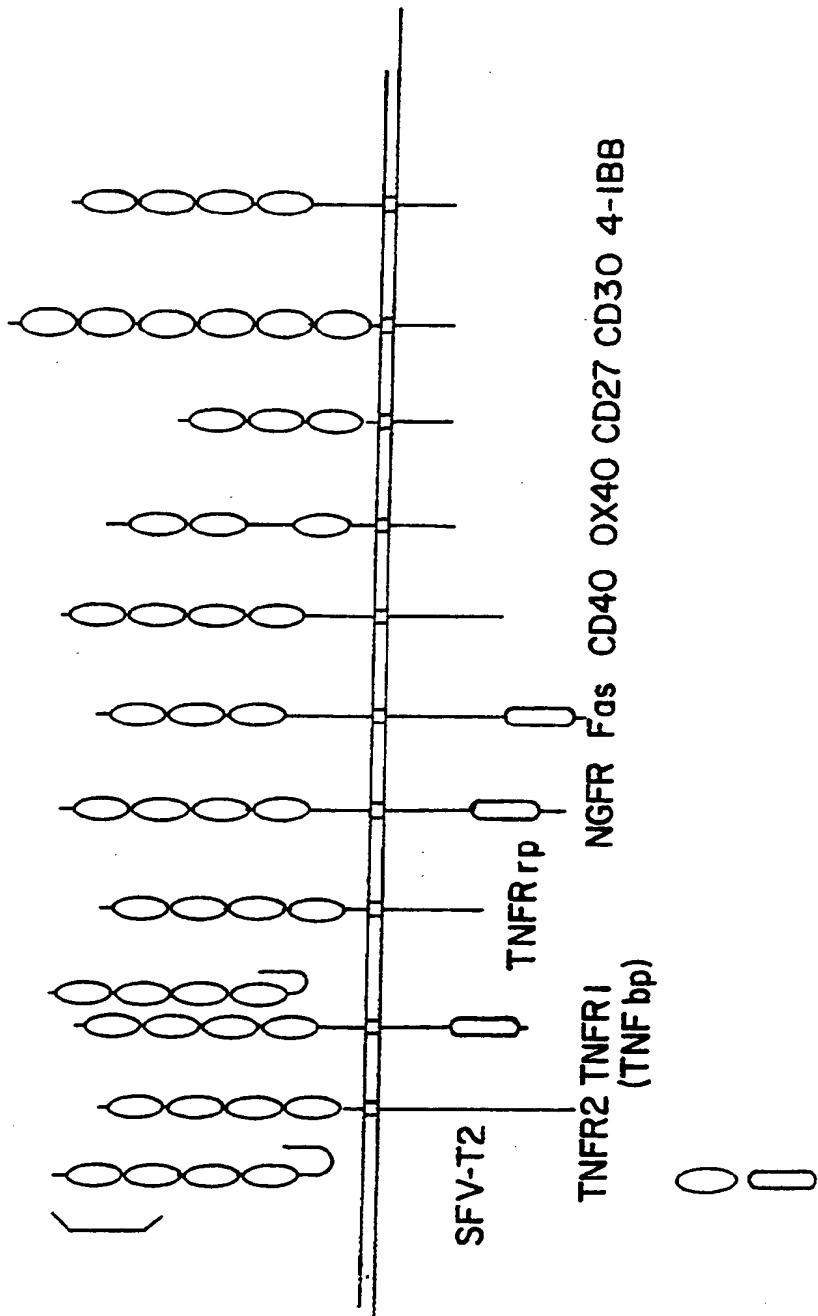


FIG.2A

SP

FIG.2B

10 30 50
 ATCAAAGGCAGGGCATACTTCCCTGTTGCCAGACCTTATATAAAACGTCATGTTCGCCTG
 70 90 110
 GGCAGCAGAGAAGCACCTAGCACTGGCCCAGCGGCTGCCGCTGAGGTTCCAGAGGACC
 130 150 170
 ACAATGAACAAGTGGCTGTGCTGCACTCCTGGTGTCTGGACATCATTGAATGGACA
 M N K W L C C A L L V F L D I I E W T
 190 210 230
 ACCCAGGAAACCTTCCTCCAAAATACTTGCATTATGACCCAGAAACCGGACGTCAGCTC
 T O E T F P P K Y L H Y D P E T G R Q L
 250 270 290
 TTGTGTGACAAATGTGCTCCTGGCACCTACCTAAACAGCACTGCACAGTCAGGAGGAAG
 L C D K C A P G T Y L K Q H C T V R R K
 310 330 350
 AACACTGTGTGTCCTGCCCTGACTACTCTTATACAGACAGCTGGCACACGAGTGATGAA
 T L C V P C P D Y S Y T D S W H T S D E
 370 390 410
 TCGCTGTACTGCAGCCCCGTGTGCAAGGAACACTGCAGACCGTGAAACAGGAGTGCAACCGC
 C V Y C S P V C K E L Q T V K Q E C N R
 430 450 470
 ACCCACAACCGAGTGTGCGAATGTGAGGAAGGGCGCTACCTGGAGCTCGAATTCTGCTTG
 T H N R V C E C E E G R Y L E L E F C L
 490 510 530
 AAGCACCGGAGCTGCCCCAGGCTGGGTGTGCTGCAGGCTGGACCCCAGAGCGAAC
 K H R S C P P G L G V L Q A G T P E R N
 550 570 590
 ACGGTTTGCAAAAGATGTCCGGATGGGTCTTCTCAGGTGAGACGTATCGAAAGCACCC
 T V C K R C P D G F F S G E T S S K A P
 610 630 650
 TGTAGGAAACACACCAACTGCAGCTCACTTGGCCTCCTGCTAATTGAAAGGAAATGCA
 C R K H T N C S S L G L L I Q K G N A
 670 690 710
 ACACATGACAATGTATGTTCCGGAAACAGAGAAGCAACTCAAATTGGAATAGATGTC
 T H D N V C S G N R E A T Q N C G I D V
 730 750 770
 ACCCTGTGCGAAGAGGCATTCTCAGGTTGCTGCCTACCAAGATTATACCGAATTGG
 T L C E E A F F R F A V P T K I I P N W
 790 810 830
 CTGAGTGTCTGGACAGTTGCCTGGACCAAAAGTGAATGCAGAGAGTGAGAGAG
 L S V L V D S L P G T K V N A E S V E R
 850 870 890
 ATAAAACGGAGACACAGCTCGCAAGAGCAAAACTTCCAGCTACTTAAGCTGGAAGCAT
 I K R R H S S Q E Q T F Q L L K L W K H
 910 930 950
 CAAAACAGAGACCAGGAAATGGTGAAGAAGATCATCCAAGACATTGACCTCTGTGAAAGC
 Q N R D Q E M V K K I I Q D I D L C E S
 970 990 1010
 AGTGTGCAACGGCATATCGGCCAGCGAACCTCACCAAGACATTGACCTCTGTGAAAGC
 S V O R H I G H A N L T T E Q L R I L M

FIG.2C

1030	1050	1070
GAGAGCTTGCCTGGAAAGAAGATCAGCCCAGACGAGATTGAGAGAACGAGAAAGACCTGC		
E S L P G K K I S P D E I E R T R K T C		
1090	1110	1130
AAACCCAGCGAGCAGCTCCTGAAGCTACTGAGCTTGAGGGATCAAAAATGGAGACCAA		
K P S E Q L L K L L S L W R I K N G D Q		
1150	1170	1190
GACACCTGAAGGCCGTATGTACGCACTCAAGCACTTGAAAGCATACCACCTTCCAAA		
D T L K G L M Y A L K H L K A Y H F P K		
1210	1230	1250
ACCGTCACCCACAGTCTGAGGAAGACCATCAGGTTCTGCACAGCTCACCATGTACCGA		
T V T H S L R K T I R F L H S F T M Y R		
1270	1290	1310
TTGTATCAGAAACTCTTCTAGAAATGATAGGGAATCAGGTTCAATCAGTGAAGATAAGC		
L Y Q K L F L E M I G N Q V Q S V K I S		
1330	1350	1370
TGCTTATAGTTAGGAATGGTCACTGGGCTGTTCTTCAGGATGGGCCAACACTGATGGAG		
C L		
1390	1410	1430
CAGATGGCTGCTTCTCCGGCTTTGAAATGGCAGTTGATTCCCTTCATCAGTTGGTGG		
1450	1470	1490
GAATGAAGATCCTCCAGCCAACACACACACTGGGGAGTCTGAGTCAGGAGAGTGAGGCA		
1510	1530	1550
GGCTATTTGATAATTGTGCAAAGCTGCCAGGTGTACACCTAGAAAGTCAAAGCACCCCTGAG		
1570	1590	1610
AAAAGAGGATATTTTATAACCTCAAACATAGGCCCTTCCTCCTCTCCTTATGGATGAG		
1630	1650	1670
TACTCAGAAGGCTTCTACTATCTTCTGTGTACATCCCTAGATGAAGGCCTCTTTATTTAT		
1690	1710	1730
TTTTTTATCTTTTCGGAGCTGGGACCGAACCCAGGGCCTTGCGCTTGCGAGGCAA		
1750	1770	1790
GTGCTCTACCACTGAGCTAAATCTCCAACCCCTGAAGGCCTCTTCTGCCTCTGAT		
1810	1830	1850
AGTCTATGACATTCTTTCTACAATTCTACAGGTGACGCCATTCCATTGAT		
1870	1890	1910
AGGTTCTAGGCAAGTTGACCGTTAGCTATTTCCCTCTGAAGATTGATTGAGTTGC		
1930	1950	1970
AGACTTGGCTAGACAAGCAGGGTAGGTTATGGTAGTTATTAACAGACTGCCACCAGG		
1990	2010	2030
AGTCCAGTGTCTTCTGTAGTTGACTTAAGCTGACTCCAAGTACATTAGTA		
2050	2070	2090
TGAAAAATAATCAACAAATTATTCCTCTATCAACATTGGCTAGCTTGTTCAGGGC		
2110	2130	2150
ACTAAAAGAAACTACTATATGGAGAAAGAATTGATATTGCCCAACGTTCAACAAACCA		
2170	2190	2210
ATAGTTATCCAGCTGTACGCCCTGGTCAGTGTACTGACTATGCCCTTATTAC		
2230	2250	2270
TGCATGCAGTAATTCAACTGGAAATAGTAATAATAATAGAAATAAAATCTAGACTCC		
2290	2310	2330
ATTGGATCTCTGAATATGGGATATCTAACTTAAGAAGCTTGAGATTTAGTTGTGT		
2350	2370	2390
TAAAGGCTTTATTAAAAAGCTGATGCTCTCTGTAAAAGTTACTAATATATCTGTAAGA		
2410	2430	
CTATTACAGTATTGCTATTATATCCATCCAG		

Nummer:

Int. Cl. 6:

Offenlegungstag:

DE 196 54 610 A1

C 07 K 14/715

26. Juni 1997

FIG. 2D

FIG.2E

fas.frg	- C R L C D E G H G L E V E I N C T R T Q N T K C R C K P N F F C N S T V C E H C D P C T K C E H G	152
tnfr1.frg	- N C S L C L N G - - T V H L S C O E K Q N T V C T C H A G F F I L R E N E C V S C S N C K K S L E C	191
sfv-t2.frg	- - - P C T G H L S E S Q P C D R T H D R Y C N C S T G N Y C L L K G O N G C R I C A P O T K C	129
tnfr2.frg	- - - - R C S S D O V E T Q A C T R E Q N R I C T C R P G W Y C A L S K Q E G C R L C A P L R K C	143
cd40.frg	- - - - - N Q G L R V K E G T A E S D T V C T C K E G Q H C T S K D C E - - - A C A Q H T P C	125
oste0.frg	- - - - - V C R E L O T V Q O S N - - V G L Q S N - - S A P C C V E A D D A V C R C A Y G Y Y - - - F C L K H R S C	124
ngfr.frg	- - - - - R S G S E L - - - - - R P G T Q P R Q D S S H - - - E K D C	116
ox40.frg	- - - - - V C A G Y E R F K K F C S S T H N A E C I E G F H C L G P Q C T R C - - - - -	105
4lbb.frg	- - - - -	
fas.frg	- - - I K E C T L T S N T K C K E - - - E G S R S N L - - - G W L C L L L P I P L I	187
tnfr1.frg	- - - T K L C L P Q I E N V K G T E - - - D S G T T V U L P L V I E F G L C L L S L L F I	230
sfv-t2.frg	- - - G H T R A G D T L C E K C P P H T Y S D S L S P T E R C G T S F N Y I S V G F N L Y	178
tnfr2.frg	- - - R P G F G V A R P G T E T T D T V C H P C P V G F F S N Q S S L S T D I C R P H C I C N V V A I P G N	193
cd40.frg	- - - I P G F G V M E M A T E T T D T V C H P C P V G F F S N Q S S L S T D I C R P H C I C N V V A I P G N	175
oste0.frg	- - - P P G L G V I L Q A G T I P E R N T V C K R C P D G T Y S G E T S S K A P C R K H T N C S S L G L L E I	174
ngfr.frg	- - - E A G S G I V F S C Q D K Q N T V C E C P D G T Y S D E A N H V D P C L P C T V C E D T E R Q L R	178
ox40.frg	- - - - - K L G V D C V P C P P G H F S P G S N - - Q A C K P W T N C T L S G K Q I R	152
4lbb.frg	- - - R P G Q E L T K Q G - - - - - C K T C S L G T E N D Q - N G T G V C R P W T N C S L D G R S V L	147
fas.frg	V W V - - - - - K R K E V Q K T C R K H R K E N Q G S H E S P T L N P E - - - - -	219
tnfr1.frg	G L M Y R Y Q R W K S K L Y S I V C G K S T P E K E G E L E G T T K P L A P N P S F S P T P G F T	280
sfv-t2.frg	P V N - - - - - E T S C T S T S P T R S M A P G A V H L P Q P V S T R S Q H T	207
tnfr2.frg	A S R - - - - - D A V C T S Q T N V I C G L K S R M R - - - - -	227
cd40.frg	Q K G - - - - - T S Q T N V C S G N R E A T Q N C G I D V T L C E E A F F R	197
oste0.frg	Q K G - - - - - N A T H D N V C S G N R E A T Q N C G I D V T L C E E A F F R	208
ngfr.frg	E C T R W A D A E C E E I P G R - - - W I T R S T - - P P E G S D S T A P S T Q E P E A P P E Q D L I	224
ox40.frg	H P A S N S V C E D R S L L A T L L W E T Q R T T F R P T V P S T V W P R T S Q L P S T P T L V	202
4lbb.frg	K T G T T E R D V V C G P P V V S F S P S T T I S V T P E G G P G - - - G H S L Q V L T L E L	191

Nummer:

DE 196 54 610 A1

Int. Cl. 6:

C 07 K 14/715

Offenlegungstag:

26. Juni 1997

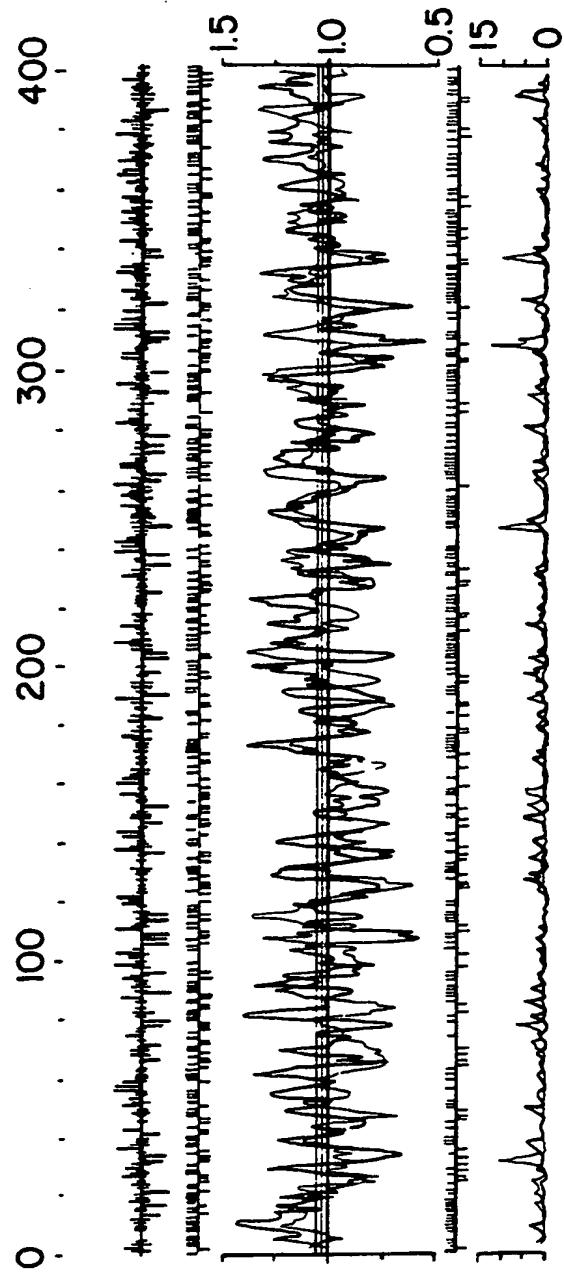


FIG. 3A

FIG. 3B

FIG. 3C

FIG. 3D

FIG. 3E

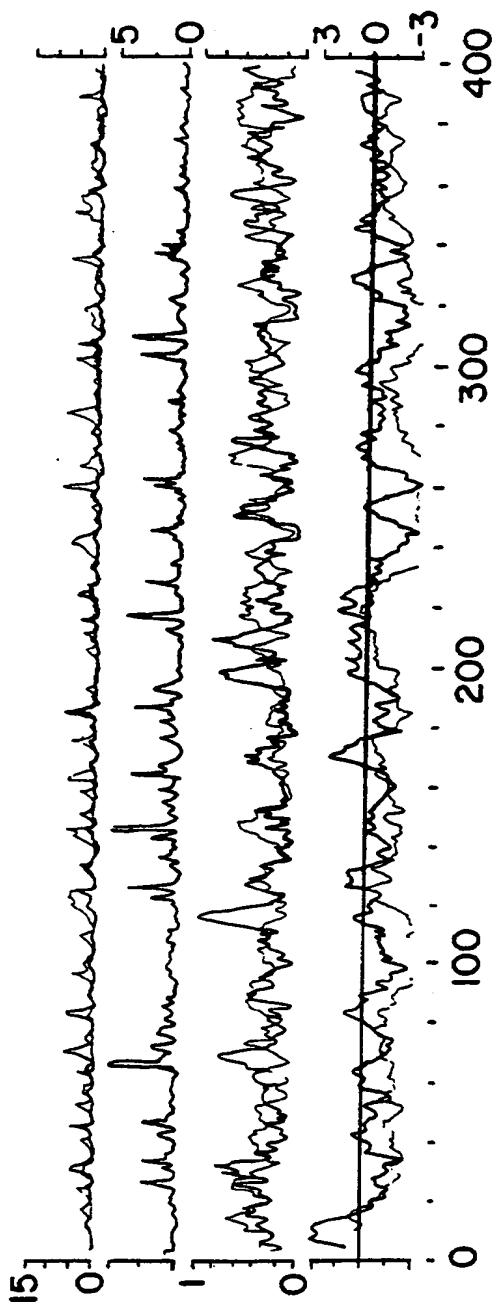


FIG. 3F

FIG. 3G

FIG. 3H

FIG. 3I

FIG.4A

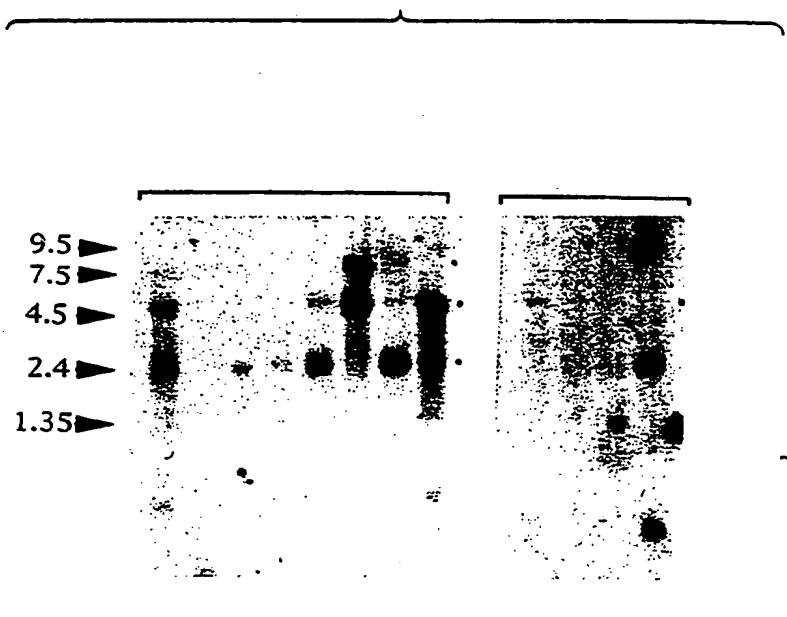
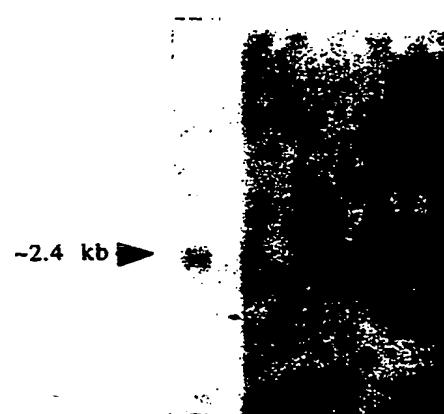


FIG.4B

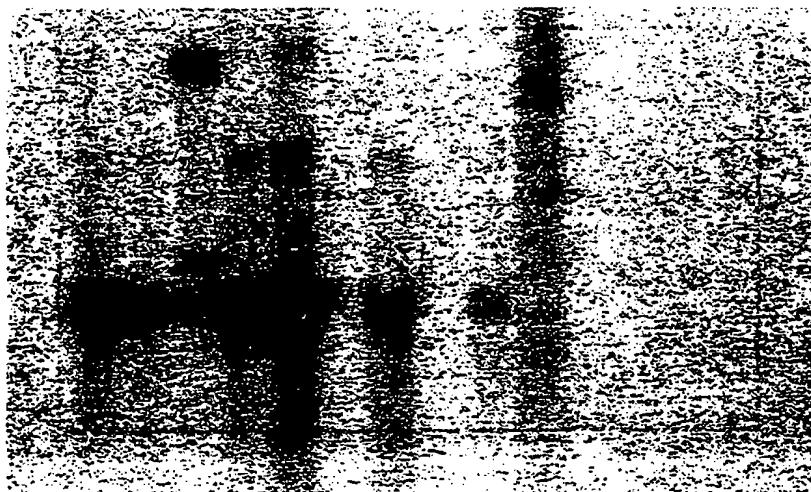


ZEICHNUNGEN SEITE 10

Nummer:
Int. Cl.⁶:
Offenlegungstag:

DE 196 54 610 A1
C 07 K 14/715
26. Juni 1997

FIG.5



2 11 16 17 22 28 33 38 45 Kb 1 12 18 30

FIG. 6A

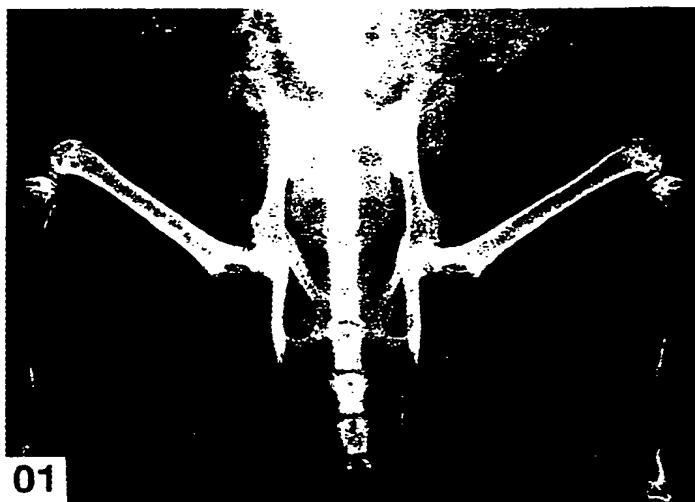


FIG. 6B

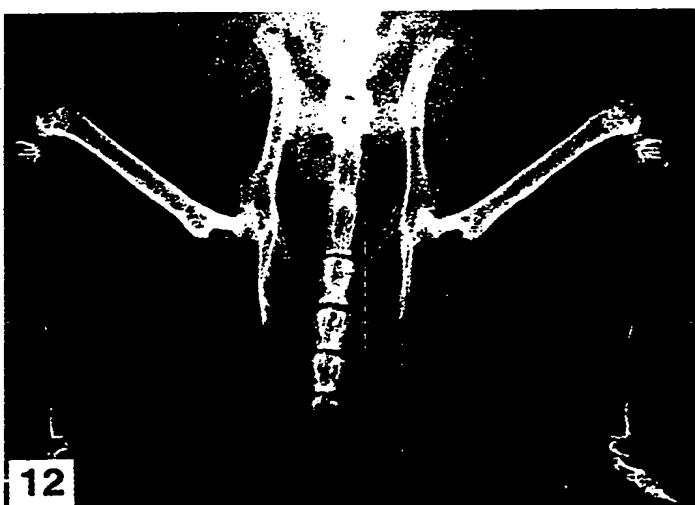


FIG. 6C



FIG. 6D

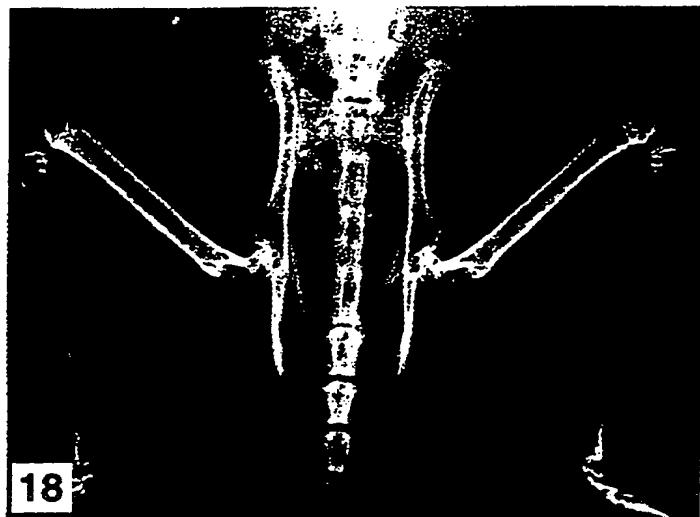


FIG. 6E



FIG. 6F

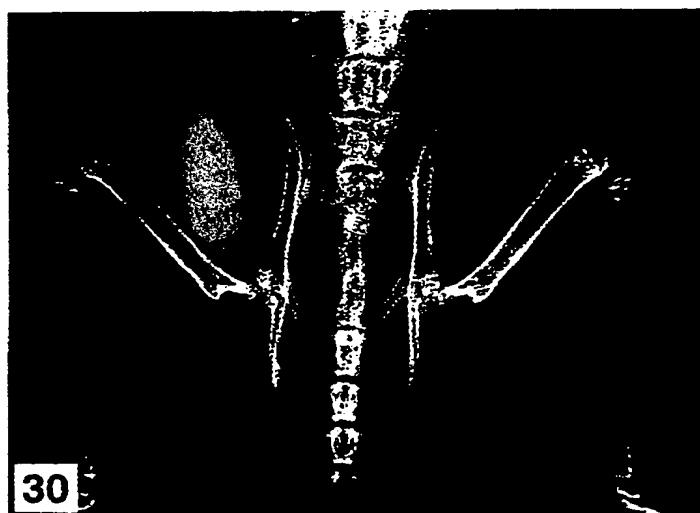
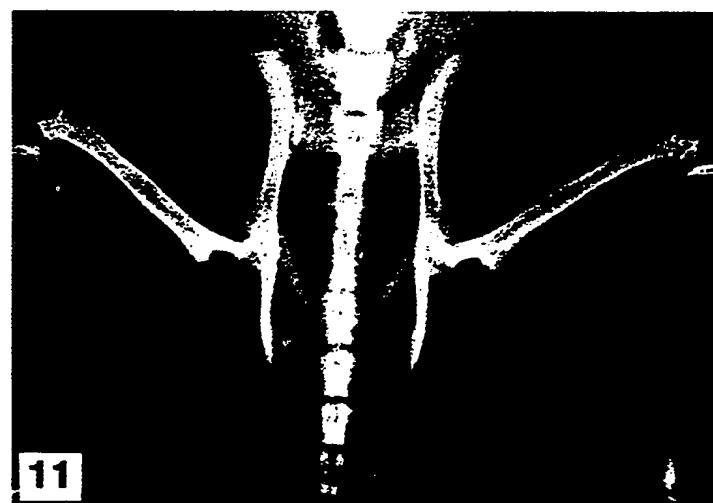


FIG.6G



FIG.6H



702 026/827

FIG.6I

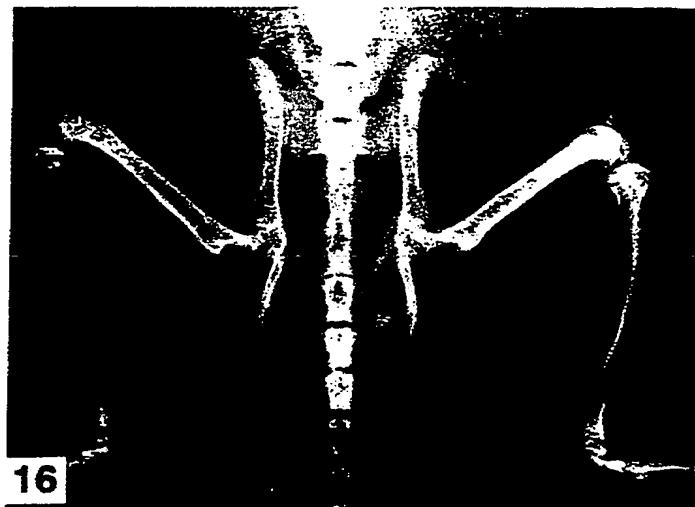


FIG.6J

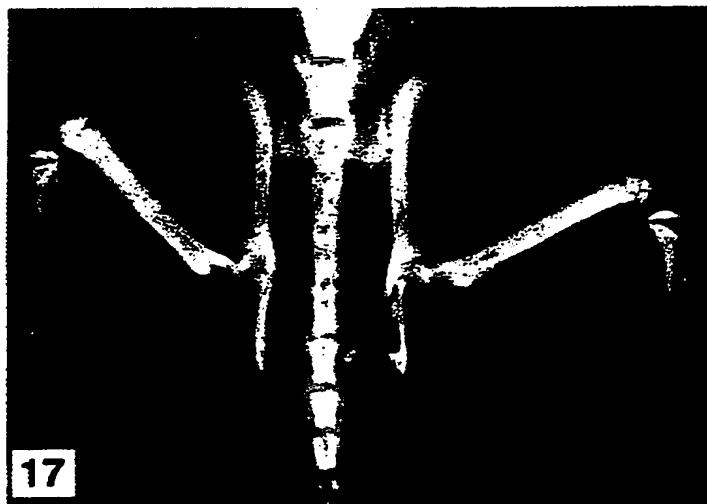


FIG.7A

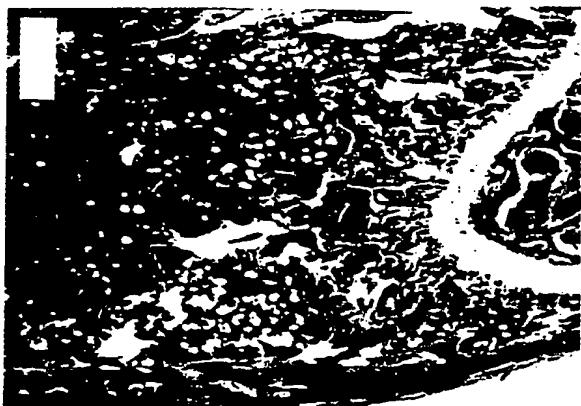


FIG.7B

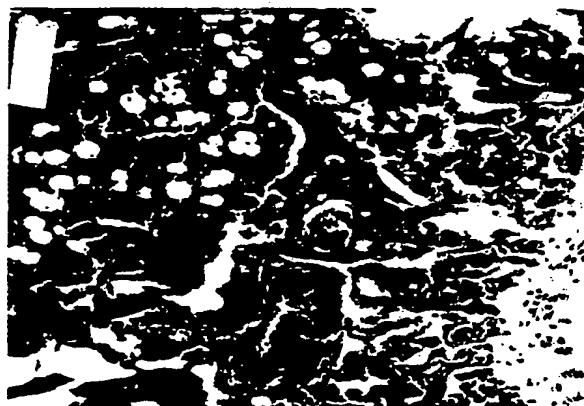


FIG.7C



FIG.7D



FIG.7E



FIG.7F

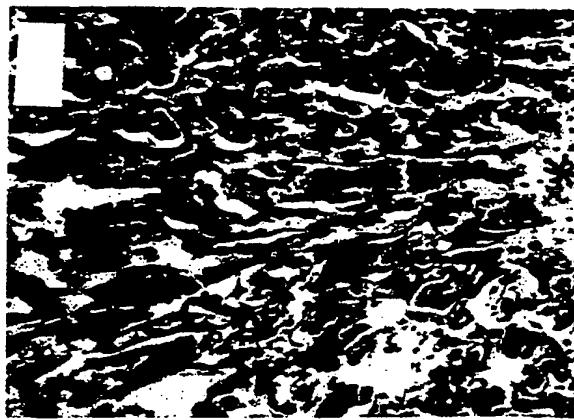


FIG.7G



FIG.7H

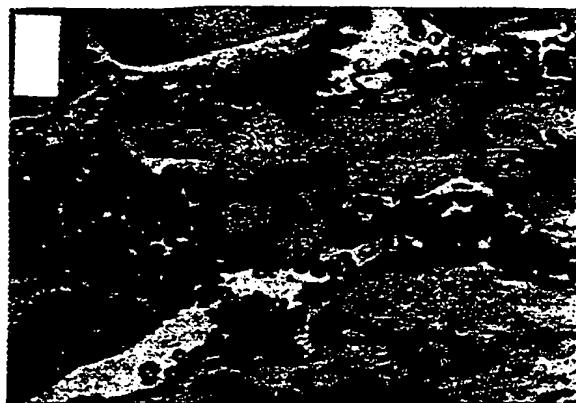


FIG.8A



FIG.8B



FIG.8C



FIG.8D

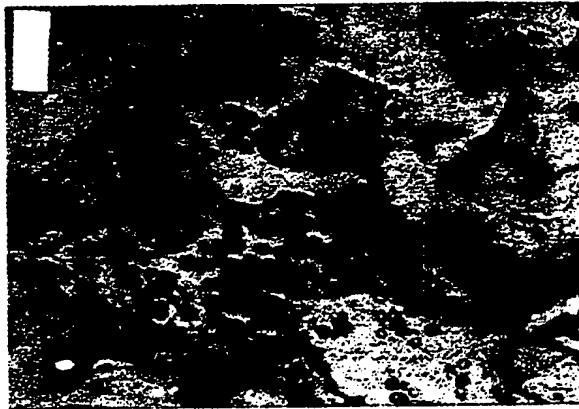


FIG.9A

10 30 50
 CCTTATATAARACGTATGATTGCCTGGCTGCAGAGACGCACCTAGCACTGACCCAGCG
 70 90 110
 GCTGCCTCCTGAGGTTCCCGAGGGACCACAATGAACAAAGTGGCTGTGCTGCCACTCCTG
M N K W L C C A L L
 130 150 170
 GTGCTCCTGGACATCATGAAATGGACAAACCCAGGAAACCCCTCCTCCAAAGTACTTGCAT
V L L D I I E W T T O E T L P P K Y L H
 190 210 230
 TATGACCCAGAAACTGGTCATCAGCTCTGTGTGACAAATGTGCTCCTGGCACCTACCTA
 Y D P E T G H Q L L C D K C A P G T Y L
 250 270 290
 AAACAGCACTGCACAGTGAGGAGGAAGACATTGTGTGTCCCTGCCCTGACCACTCTTAT
 K Q H C T V R R K T L C V P C P D H S Y
 310 330 350
 ACGGACAGCTGGCACACCAAGTGATGAGTGTGTATTGCAGCCCAGTGTGCAAGGAAC TG
 T D S W H T S D E C V Y C S P V C K E L
 370 390 410
 CAGTCCGTGAAGCAGGAGTGCAACCGCACCCACAACCGAGTGTGTGAGTGAGGAAGGG
 Q S V K Q E C **N** R T H N R V C E C E E G
 430 450 470
 CGTTACCTGGAGATCGAATTCTGCTTGAAGCACCGGAGCTGTCCCCCGGGCTCCGGCGTG
 R Y L E I E F C L K H R S C P P G S G V
 490 510 530
 GTGCAAGCTGGAACCCCAGAGCGAAACACAGTTGCAAAAAATGTCCAGATGGTTCTTC
 V Q A G T P E R N T V C K K C P D G F F
 550 570 590
 TCAGGTGAGACTTCATCGAAAGCACCCGTATAAACACACAGAACACTGCAGCACATTGGC
 S G E T S S K A P C I K H T N C S T F G
 610 630 650
 CTCCTGCTAATTCAAGAAAGGAAATGCAACACATGACAACGTGTGTTCCGGAAACAGAGAA
 L L L I Q K G **N** A T H D N V C S G N R E
 670 690 710
 GCCACGCAAAAGTGTGGAATAGATGTCACCCGTGTGAAGAGGGCTTCAAGTTGCT
 A T Q K C G I D V T L C E E A F F R F A
 730 750 770
 GTTCCTACCAAGATTATACCAAATTGGCTGAGTGTGTTGGACAGTTGCCTGGACC
 V P T K I I P N W L S V L V D S L P G T

FIG. 9B

790	810	830
AAAGTGAATGCCGAGAGTGTAGAGAGGATAAAACGGAGACACAGCTCACAAAGAGCAAACC		
K V N A E S V E R I K R R H S S S Q E Q T		
850	870	890
TTCCAGCTGCTGAAGCTGTGAAACATCAAAACAGAGACCAGGAAATGGTGAAGAAGATC		
F Q L L K L W K H Q N R D Q E M V K K I		
910	930	950
ATCCAAGACATTGACCTCTGTGAAAGCAGCGTGAGCGGCATCTCGGCCACTCGAACCTC		
I Q D I D L C E S S V Q R H L G H S N L		
970	990	1010
ACACACAGAGCAGCTTCTGCCTTGATGGAGAGCCTGCCTGGAAAGAAGATCAGCCCAGAA		
T T E Q L L A L M E S L P G K K I S P E		
1030	1050	1070
GAGATTGAGAGAACGAGAAAGACCTGCAAATCGAGCGAGCAGCTCCTGAAGCTACTCAGT		
E I E R T R K T C K S S E Q L L K L L S		
1090	1110	1130
TTATGGAGGATCAAAAATGGTGACCAAGACACCTTGAGGGCCTGATGTATGCCCTCAAG		
L W R I K N G D Q D T L K G L M Y A L K		
1150	1170	1190
CACTTGAAAAACATCCCACTTTCCCAAAACTGTACCCACAGTCTGAGGAAGACCATGAGG		
H L K T S H F P K T V T H S L R K T M R		
1210	1230	1250
TTCCCTGCACAGCTTCACAATGTACAGACTGTATCAGAAGCTTTAGAAATGATAGGG		
F L H S F T M Y R L Y Q K L F L E M I G		
1270	1290	1310
AATCAGGTTCAATCCGTAAAATAAGCTGCTTATAACTAGGAATGGTCACTGGCTGTTT		
N Q V Q S V K I S C L		

CTTCA

FIG. 9C

10	30	50
GTATATATAACGTGATGAGCGTACGGGTGCGGAGACGCACCGGAGCGCTGCCAGCCGC		
70	90	110
CGYCTCCAAGCCCCCTGAGGTTCCGGGGACCACAATGAACAAGTTGCTGTGCTGCCGCT		
	<u>M N K L L C C A L</u>	
130	150	170
CGTGTTCTGGACATCTCATTAAAGTGGACCACCCAGGAAACGTTCTCCAAAGTACCT		
V F L D I S I K W T T O E T F P P K Y L		
190	210	230
TCATTATGACGAAGAAACCTCTCATCAGCTGTTGTGACAAATGTCCCTGGTACCTA		
H Y D E E T S H Q L L C D K C P P G T Y		
250	270	290
CCTAAAACAACACTGTACAGCAAAGTGGAGACCGTGTGCGCCCTGCCCTGACCACTA		
L K Q H C T A K W K T V C A P C P D H Y		
310	330	350
CTACACAGACAGCTGGCACACCAGTGACGAGTGTCTACTGCAGCCCCGTGTGCAAGGA		
Y T D S W H T S D E C L Y C S P V C K E		
370	390	410
GCTGCAGTAGTCAAGCAGGAGTGCAATGCACCCACAACCGCGTGTGCAATGCAAGGA		
L Q Y V K Q E C N R T H N R V C E C K E		
430	450	470
AGGGCGCTACCTTGAGATAGAGTTCTGCTTGAAACATAGGAGCTGCCCTGGATTTGG		
G R Y L E I E F C L K H R S C P P G F G		
490	510	530
ACTGGTGCAAGCTGGAACCCCAGAGCGAAATACAGTTGCAAAAGATGTCCAGATGGGTT		
V V Q A G T P E R N T V C K R C P D G F		
550	570	590
CTTCTCAAATGAGACGTCACTAAAGCACCCGTAGAAAACACACAAATTGCAGTGTCTT		
F S N E T S S K A P C R K H T N C S V F		
610	630	650
TGGTCTCCTGCTAACTCAGAAAGGAAATGCAACACACGACAAACATATGTTCCGGAAACAG		
G L L L T Q K G N A T H D N I C S G N S		
670	690	710
TGAATCAACTAAAAATGTGGAATAGATGTTACCCGTGTGAGGAGGCATTCTCAGGTT		
E S T Q K C G I D V T L C E E A F F R F		
730	750	770
TGCTGTTCTACAAAGTTACGCCACTGGCTTAGTGTCTGGTAGACAATTGCCTGG		
A V P T K F T P N W L S V L V D N L P G		

FIG.9D

790 CACCAAAGTAAACGCAGAGAGTGAGAGAGGATAAAAACGGCAACACAGCTACAAGAACAT T K V N A E S V E R I K R Q H S S Q E Q 850 GACTTTCCAGCTGCTGAAGTTATGGAAACATCAAAACAAAGACCAAGATATAGTCAGAA T F Q L L K L W K H Q N K D Q D I V K K 910 GATCATCCAAGATATTGACCTCTGTGAAAACAGCGTGAGCGGCACATTGGACATGCTAA I I Q D I D L C E N S V Q R H I G H A N 970 CCTCACCTTCGAGCAGCTCGTAGCTTGATGGAAAGCTTACCGGGAAAGAAAGTGGAGC L T F E Q L R S L M E S L P G K K V G A 1030 AGAAGACATTGAAAAACATAAAGGCATGCAAACCCCAGTGACCAGATCCTGAAGCTGCT E D I E K T I K A C K P S D Q I L K L L 1090 CAGTTTGTGGCGAATAAAAAATGGCGACCAAGACACCTTGAAGGGCTTAATGCACGCACT S L W R I K N G D Q D T L K G L M H A L 1150 AAAGCACTCAAAGACGTACCACTTCCCCAAACTGTCACTCAGAGTCTAAAGAAGACCAT K H S K T Y H F P K T V T Q S L K K T I 1210 CAGGTTCTTCACAGCTTACAATGTACAAATTGTATCAGAAGTTTTTAGAAATGAT R F L H S F T M Y K L Y Q K L F L E M I 1270 AGGTAACCAGGTCCAATCAGTAAAAATAAGCTGCTTATAACTGGAAATGGCCATTGAGCT G N Q V Q S V K I S C L 1330 GTTTCCTCACAAATTGGCGAGATCCCATGGATGATAA	810 870 930 950 990 1010 1050 1070 1110 1130 1170 1190 1230 1250 1290 1310 1350	830 890 950 1070 1130 1190 1250 1310
---	---	---

FIG. 9E

muosteо.frg	M N K W L C C A L L V L L D I I E W T T Q E T L P P K Y L H Y D P E T G H Q I L L C D K C A P G T Y L	50
ratoстео.frg	M N K W L C C A L L V F L D I I E W T T Q E T F P P K Y L H Y D P E T G R Q I L L C D K C A P G T Y L	50
huosteо.frg	M N K W L C C A L V F L D I S I K W T T Q E T F P P K Y L H Y D E T S H O L L C D K C P P G T Y L	50
muosteо.frg	K Q H C T V R R K T L C V P C P D H S Y T D S W H T S D E C V Y C S P V C K E L Q S V K Q E C N R T	100
ratosteen.frg	K Q H C T V R R K T L C V P C P D Y S Y T D S W H T S D E C V Y C S P V C K E L Q T V K Q E C N R T	100
huosteо.frg	K Q H C T A K W K T V C A P C D H Y T D S W H T S D E C L Y C S P V C K E L Q Y V K Q E C N R T	100
muosteо.frg	H N R V C E C E E G R Y L E I E F C L K H R S C P P G S G V V Q A G T P E R N T V C K K C P D G F F	150
ratosteen.frg	H N R V C E C E E G R Y L E I E F C L K H R S C P P G L G V L Q A G T P E R N T V C K K C P D G F F	150
huosteо.frg	H N R V C E C E G R Y L E I E F C L K H R S C P P G F G V V Q A G T P E R N T V C K K C P D G F F	150
muosteо.frg	S G E T S S K A P C I K H T N C S T F G L L I O K G N A T H D N V C S G N R E A T Q K C G I D V T	200
ratosteen.frg	S G E T S S K A P C R K H T N C S S L G L L I O K G N A T H D N V C S G N R E A T Q N C G I D V T	200
huosteо.frg	S N E T S S K A P C R K H T N C S V F G L L T O K G N A T H D N I C S G N S E S T Q K C G I D V T	200

Numm r:
Int. Cl.⁶:
Offenlegungstag:

DE 196 54 610 A1
C 07 K 14/715
26. Juni 1997

FIG. 9F

muosteо.frg L C E E A F F R F A V P T K I I P N W L S V L V D S I L P G T K V N A E S V E R I K R R H S S Q E Q T
 ratosteо.frg L C E E A F F R F A V P T K I I P N W L S V L V D S I L P G T K V N A E S V E R I K R R H S S Q E Q T
 huosteо.frg L C E E A F F R F A V P T K F T P N W L S V L V D N I L P G T K V N A E S V E R I K R Q H S S Q E Q T
 250
 250
 250

muosteо.frg F Q L L K L W K H Q N R D Q E M V K K I I Q D I D L C E S S V Q R H I L G H S N L T T E Q L L A L M E
 ratosteо.frg F Q L L K L W K H Q N R D Q E M V K K I I Q D I D L C E S S V Q R H I G H A N L T T E Q L R I L M E
 huosteо.frg F Q L L K L W K H Q N K D Q D T V K K I I Q D I D L C E N S V Q R H I G H A N L T F E Q L R S L M E
 300
 300
 300

muosteо.frg S L P G K K I S P E E I E R T R K T C K S S E Q L L K L S L W R I K N G D Q D T I L K G L M Y A L K
 ratosteо.frg S L P G K K I S P D E I E R T R K T C K P S S E Q L L K L S L W R I K N G D Q D T I L K G L M Y A L K
 huosteо.frg S L P G K K V G A E D D I E K T I K A C K P S D Q I T L K L S L W R I K N G D Q D T I L K G L M H A L K
 350
 350
 350

muosteо.frg H L K T S H F P K T V T H S L R K T M R F L H S F T M Y R L Y Q K L F L E M I G N Q V Q S V K I S C
 ratosteо.frg H L K A Y H F P K T V T H S L R K T I T R F L H S F T M Y R L Y Q K L F L E M I G N Q V Q S V K I S C
 huosteо.frg H S K T Y H F P K T V T Q S L K K T I T R F L H S F T M Y K L Y Q K L F L E M I G N Q V Q S V K I S C
 400
 400
 400

muosteо.frg L
 ratosteо.frg L
 huosteо.frg L
 401
 401
 401

Nummer:
 Int. Cl.⁶:
 Offenl. gunsttag:

DE 196 54 610 A1
 C 07 K 14/715
 26. Juni 1997

FIG. 10

1tnrr C P Q - G K Y I H P Q N N S I C T K C H K G T Y L Y N D C P G P G Q D T D C R E C E S G S F T A S
 humoste P P K Y L H Y D E E T S H Q L L C D K C P P G T Y L K Q H C T A K - W K T V C A P C P D H Y T D S 49

1tnrr E N H L R H C L S C S - K C R K E M G Q V E I S S C T V D R D T V C G C R K N Q Y R H Y W S E N L F
 humoste W H T S D E C L Y C S P V C - K E L Q Y Y K - Q E C N R T H N R V C E C K K E G R Y L E I - - E - F 98

1tnrr Q C F N C S L C L N G - T V H L S C Q E K Q N T V C T - C H A G F F L R E - - - N E C V S C
 humoste - C L K H R S C P P G F C V V Q A G T P E R N T V C R C P D G F F S N E T S S K A P C R K H 139

Nummer:
 Int. Cl. 6:
 Offenlegungstag:

DE 196 54 610 A1
C 07 K 14/715
26. Juni 1997

FIG. II

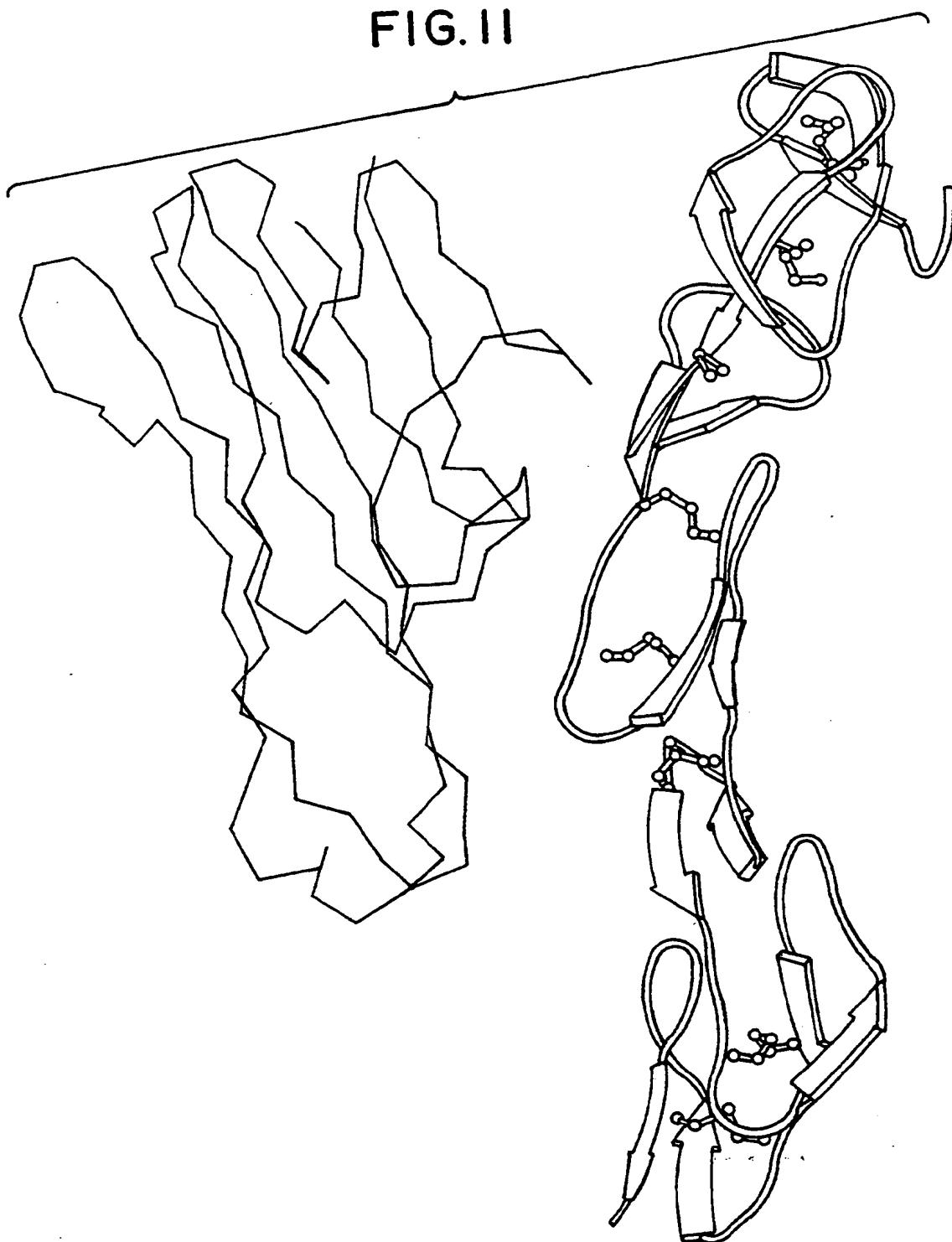
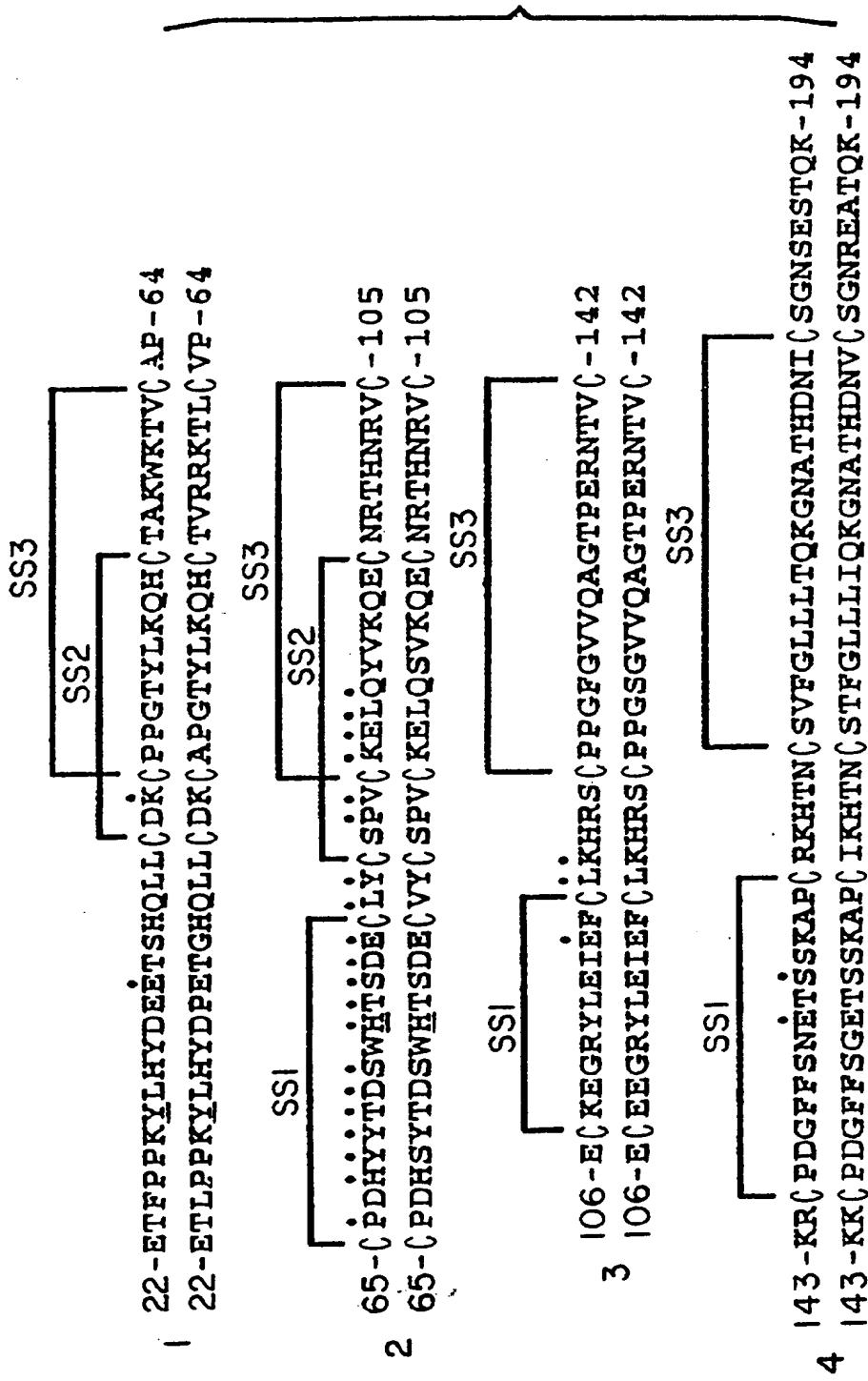


FIG. 12A



Nummer:
Int. Cl.⁶:
Offenlegungstag:

DE 196 54 610 A1
C 07 K 14/715
26. Juni 1997

FIG. 12B

195 - C G I D V T I C E E A F F R A P T K F T P N W L S V L V D N L P G T K V N A E S V E R I K R H S S - 2 4 6
195 - C G I D V T I C E E A F F R A P T K I I P N W L S V L V D S L P G T K V N A E S V E R I K R H S S - 2 4 6

247 - Q E Q T F Q L L K L W K H Q M K D O D I V K K I I Q D D I C E N S V Q R H I G H A N L T F E Q I R S L - 2 9 8
247 - Q E Q T F Q L L K L W K H Q M R D Q E M V K K I I Q D D I C E S S V Q R H L G H S N L T T E Q L L A L - 2 9 8

299 - M E S L P G K R K V G A E D I E R T T R K C R P S D Q I L K L L S L W R I K N G D Q D T L K G L M H A L K - 3 5 0

299 - M E S L P G K R K I S P E E E I E R T R R K T C R S S E Q L L K L L S L W R I K N G D Q D T L K G L M Y A L K - 3 5 0

351 - H S K T Y H F P K T V T Q S L K K T T I R F L H S F T M Y K L Y Q K L F L E M I G N Q V Q S V K I S C L - 4 0 1

351 - H L K T S H E P K T V T H S L R K T M R F L H S F T M Y R L Y Q K L F L E M I G N Q V Q S V K I S C L - 4 0 1

Numm r:

DE 196 54 610 A1

Int. Cl. 6:

C 07 K 14/715

Offenlegungstag:

26. Juni 1997

FIG.13A

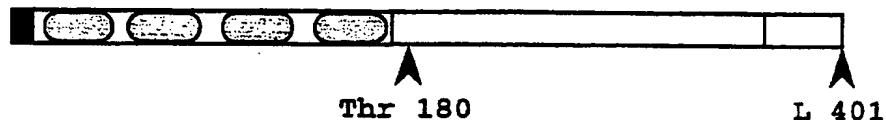


FIG.13B

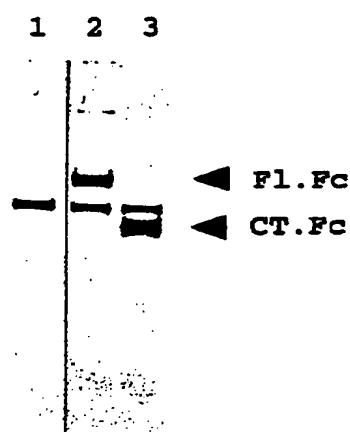


FIG.13C

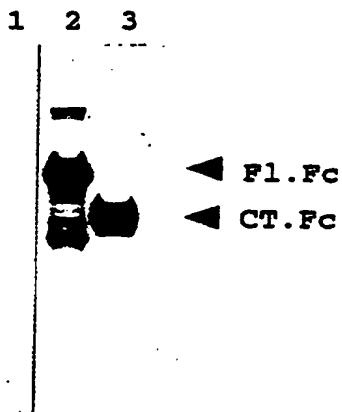
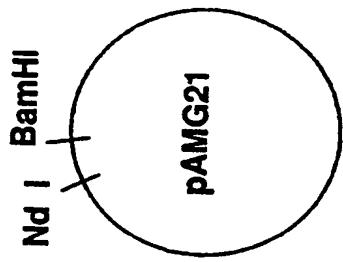
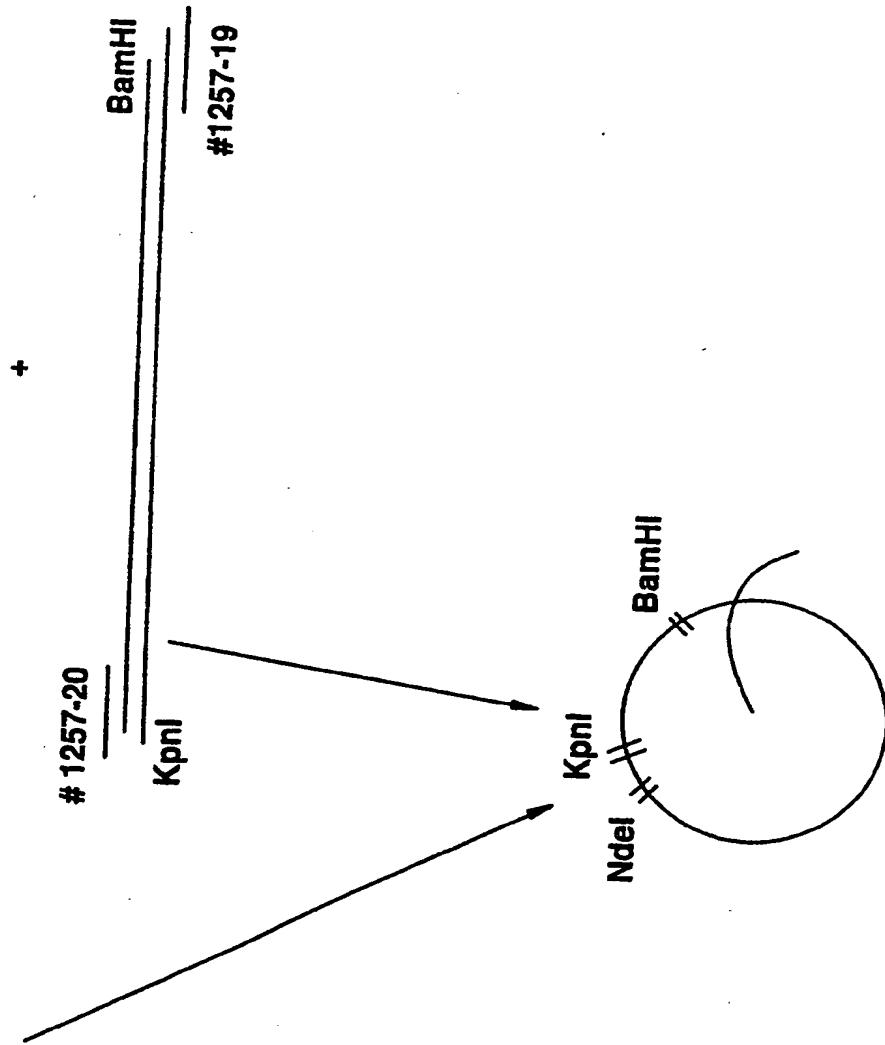


FIG. 14A



TATGGATGAAGAAACTTCTCATCAGCTGCTGTGATAATGCCGGGTAC
ACCTACTTCTTGAAAGTAGTCGACACACTTACAGGGGCC



Nummer:
Int. Cl.⁶:
Offenlegungstag:

DE 196 54 610 A1
C 07 K 14/715
26. Juni 1997

FIG. 14B

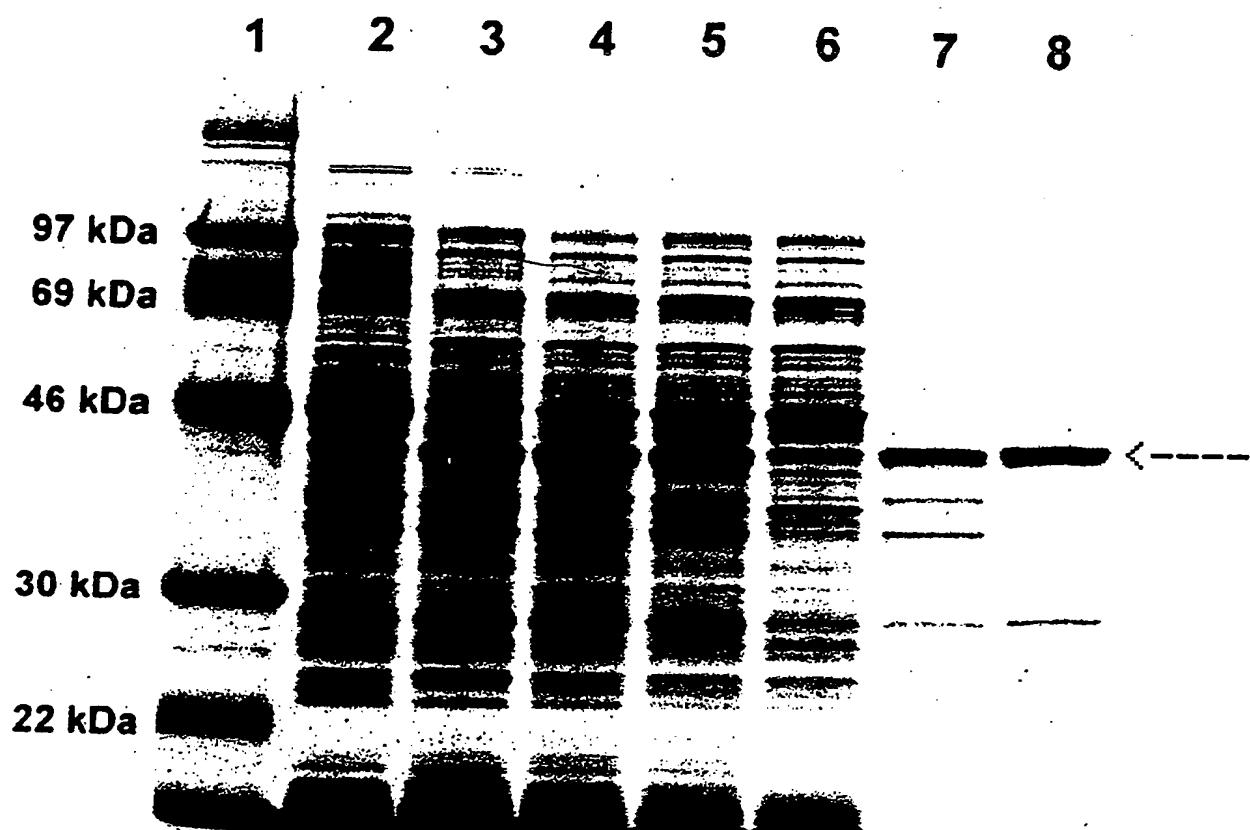


FIG. 15

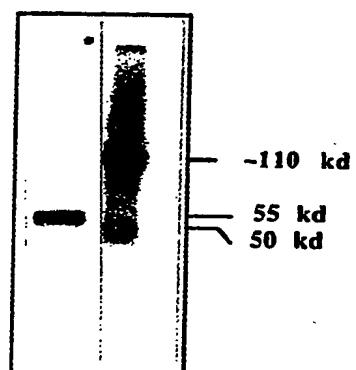


FIG. 16A

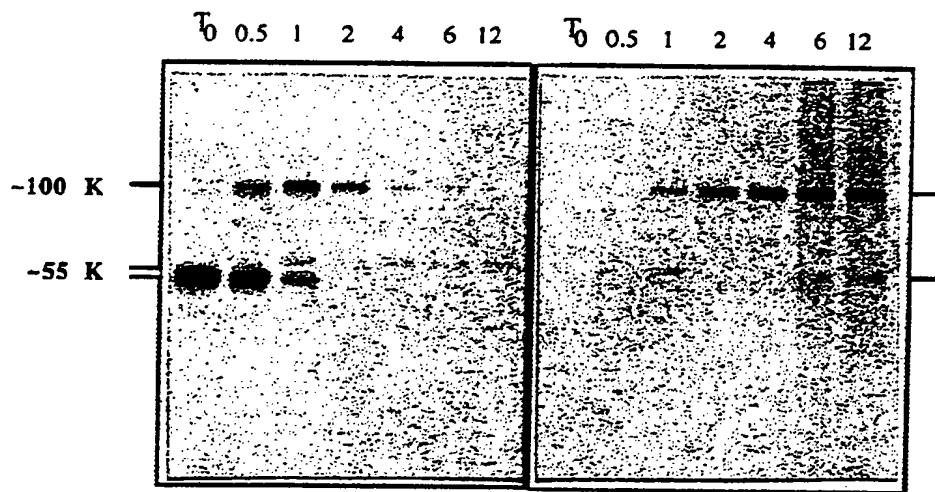


FIG. 16B

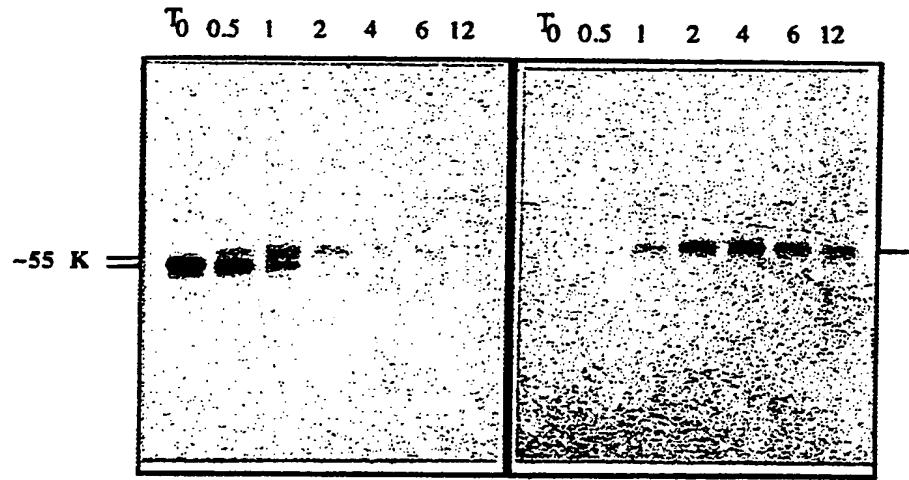


FIG. 17

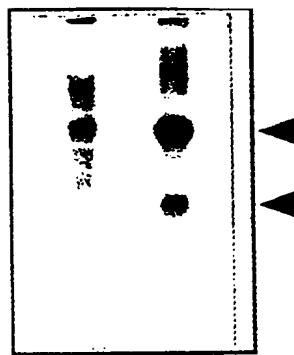


FIG. 18

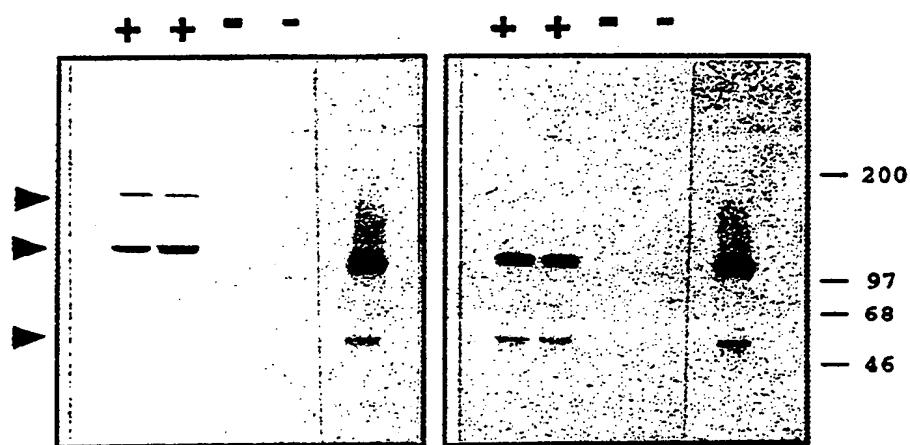


FIG. 19A

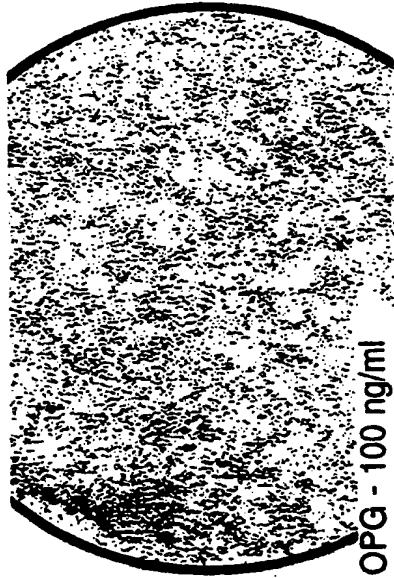


FIG. 19B

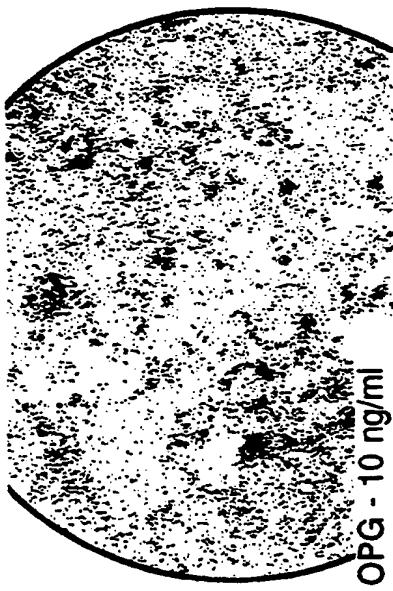


FIG. 19C

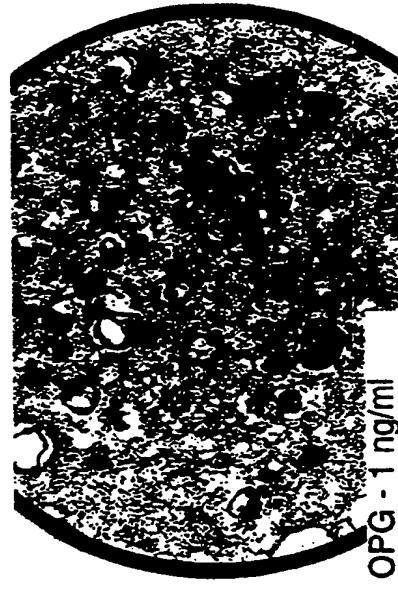
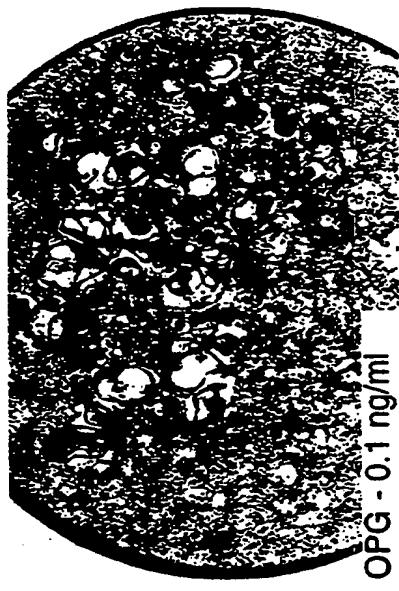


FIG. 19D



Nummer:

DE 196 54 610 A1

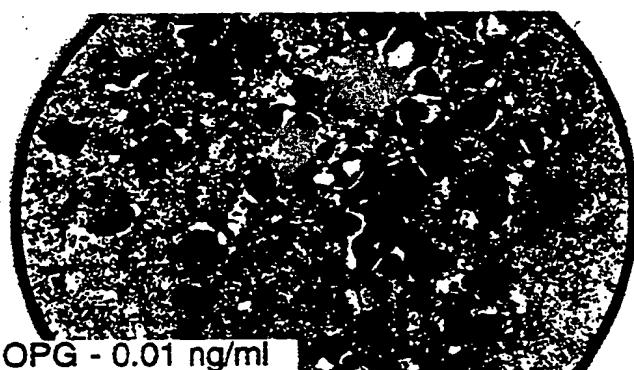
Int. Cl. 6:

C 07 K 14/715

Offenlegungstag:

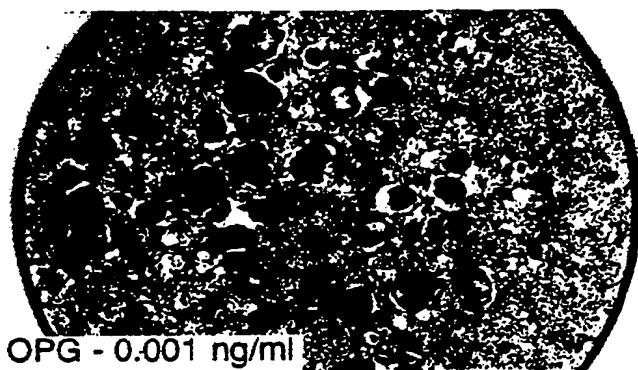
26. Juni 1997

FIG. 19E



OPG - 0.01 ng/ml

FIG. 19F



OPG - 0.001 ng/ml

FIG. 19G

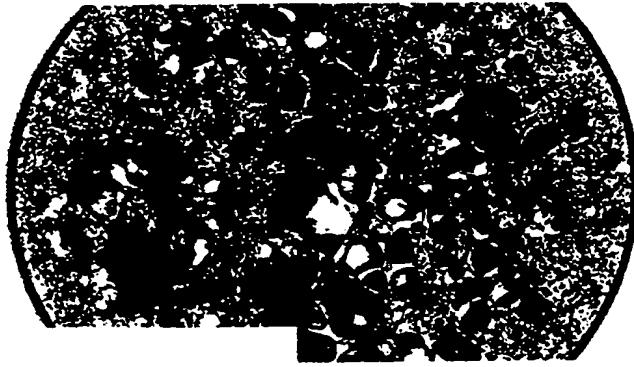


FIG.20

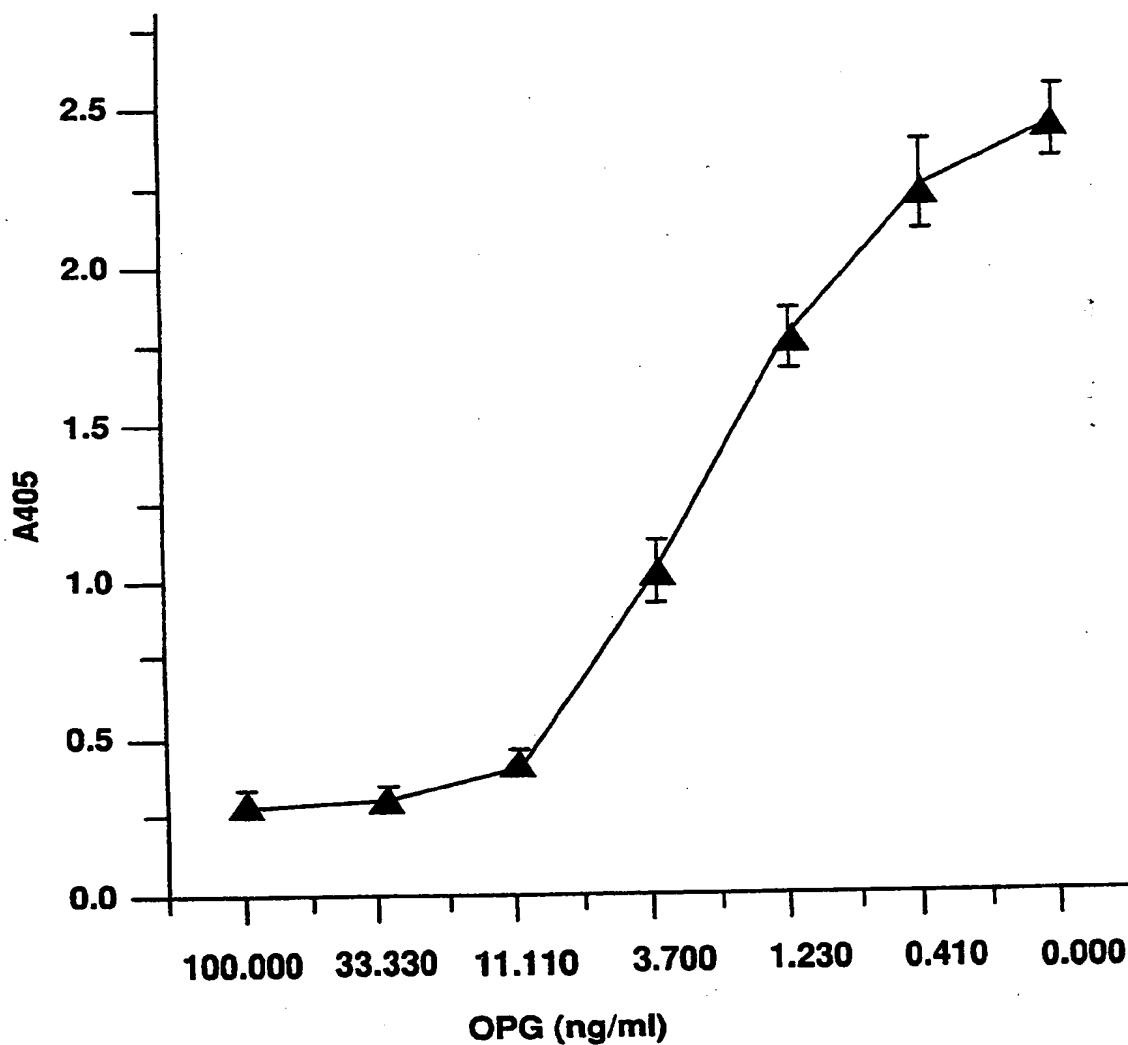


FIG.21

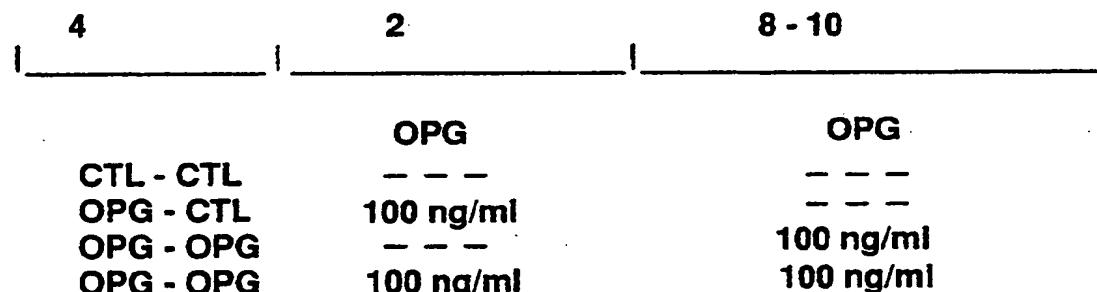
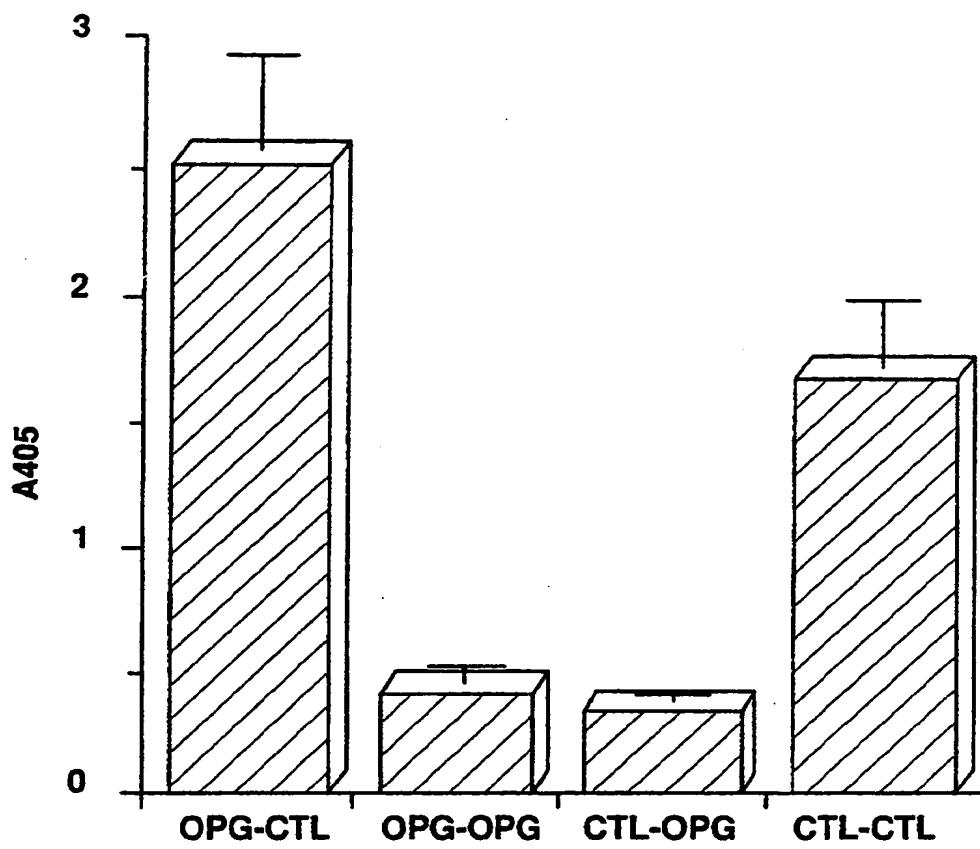


FIG. 22A

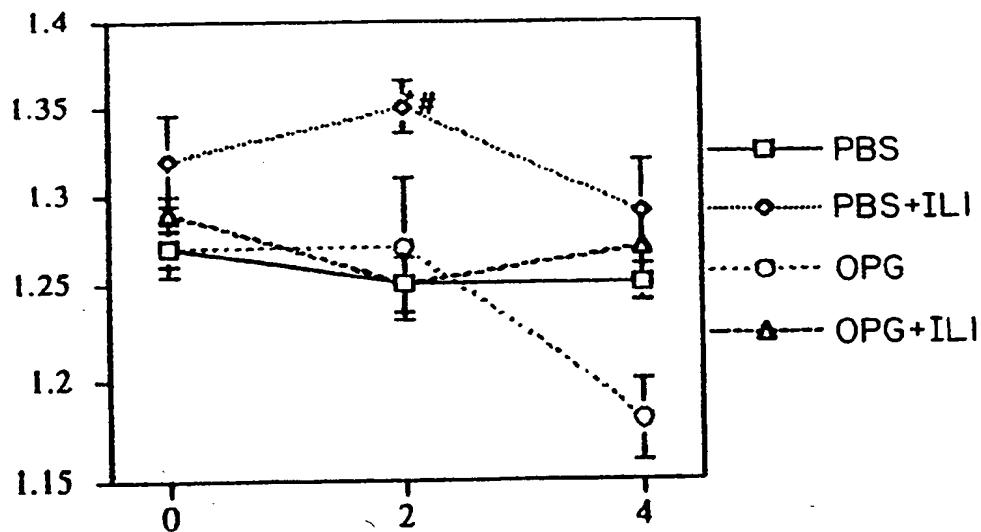
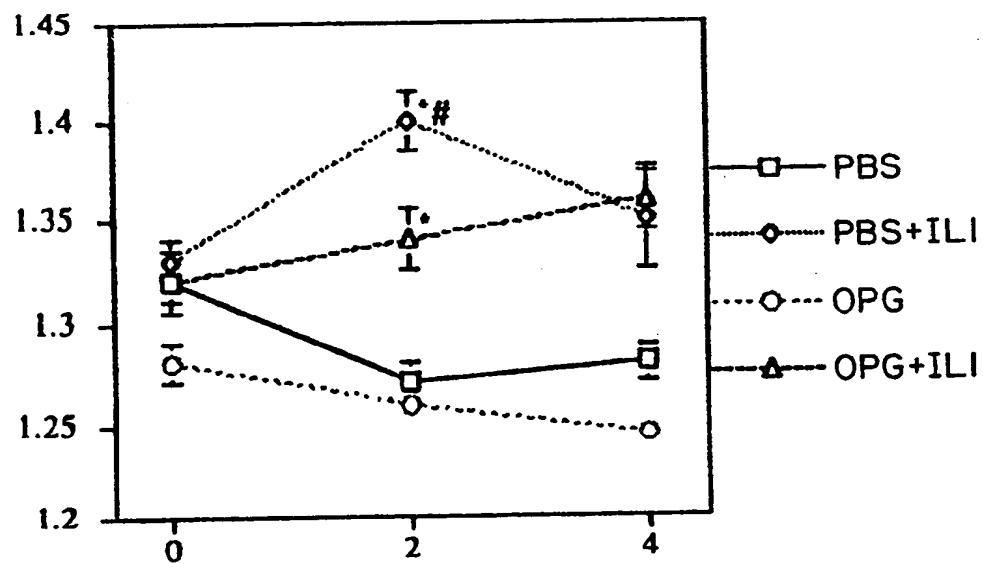


FIG. 22B



#

FIG.23A

PBS/PBS

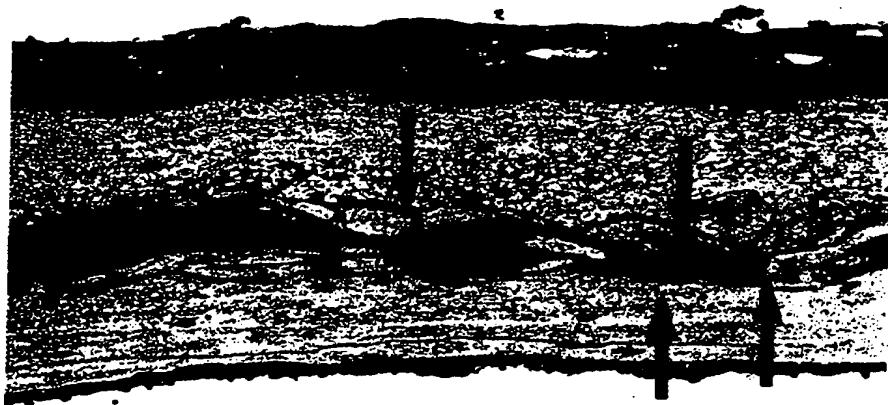


FIG.23B



FIG.23C

PBS/OPG

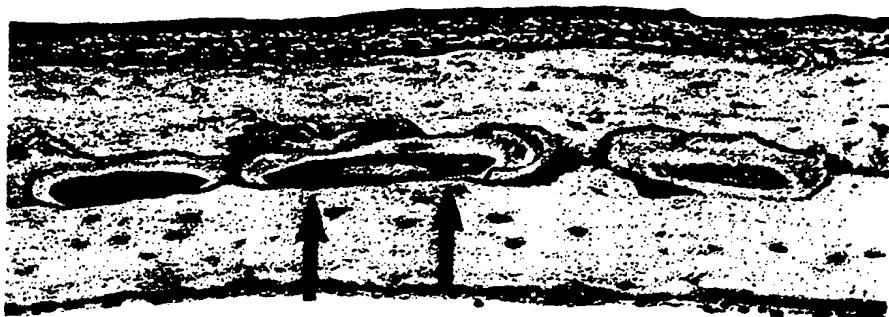


FIG.23D

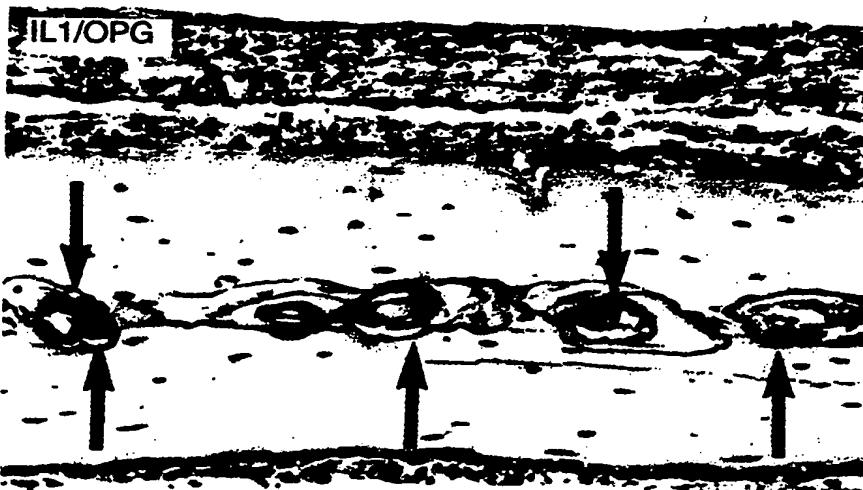


FIG. 24A
FIG. 24B

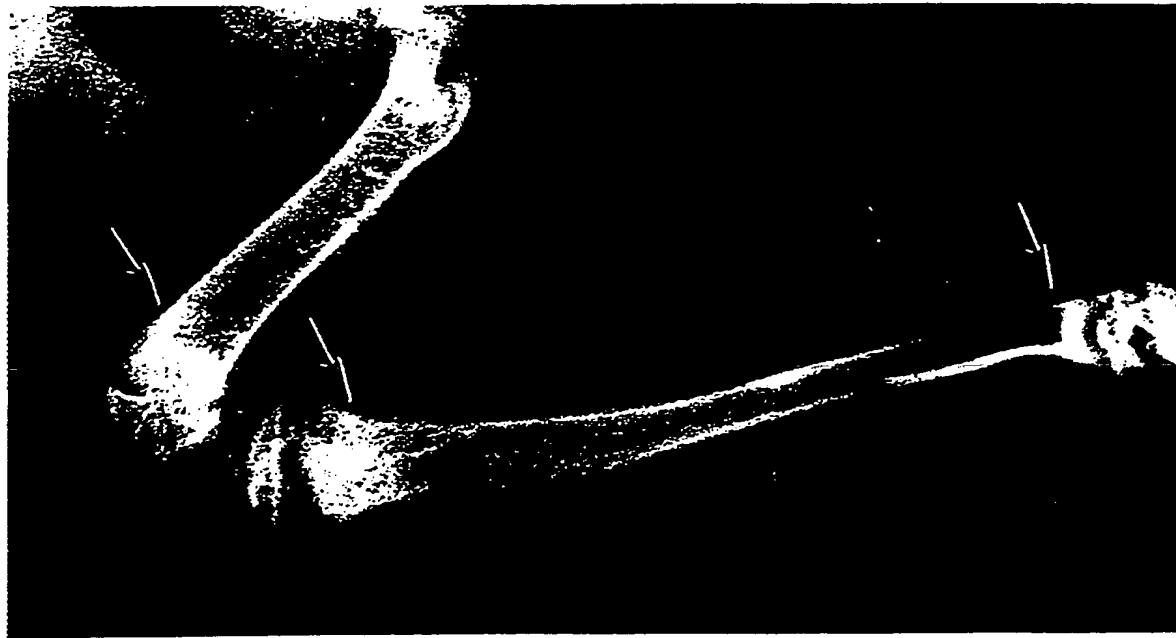


FIG. 25

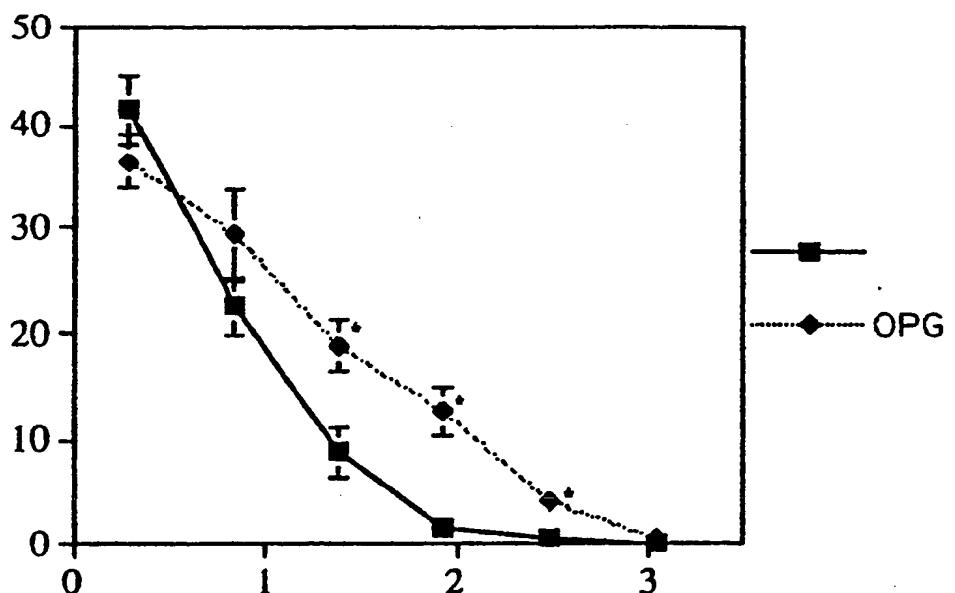


FIG. 26.A
FIG. 26.B



FIG. 27

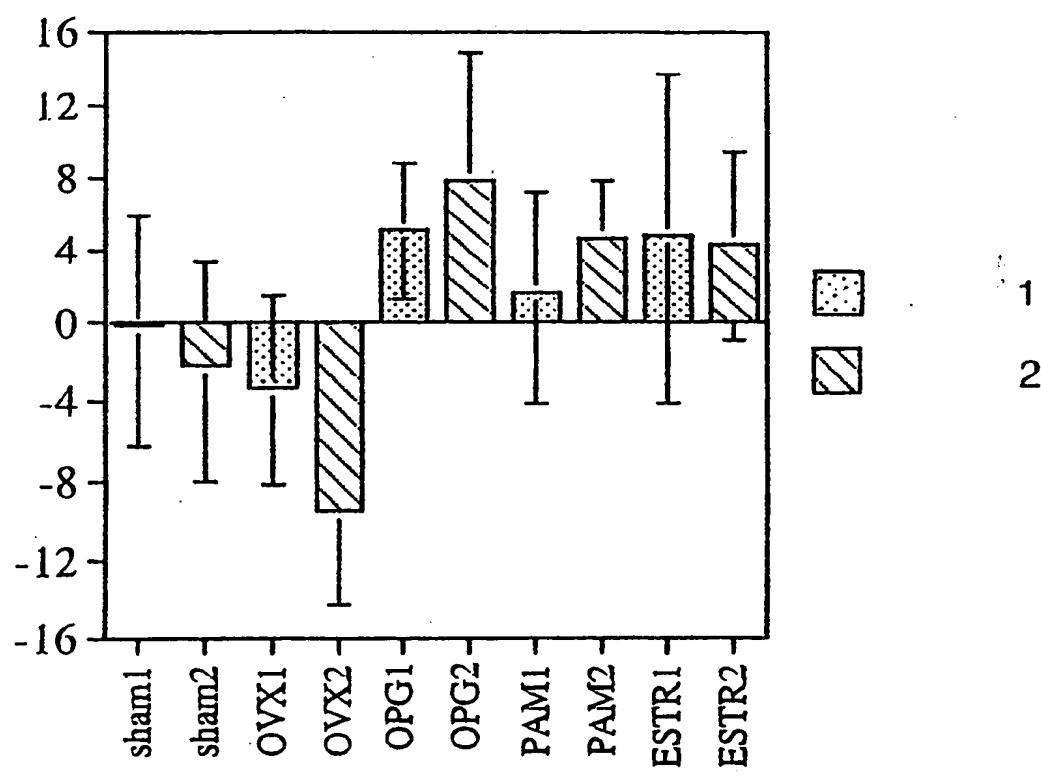


FIG.28

